DIE Z-ACTINOMYCINE

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
ERNST-AUGUST STÄHLER
aus Twielenfleth/Stade

Göttingen 1966

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544307_0031

Die Z-Actinomycine

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

E r n s t - A u g u s t S t ä h l e r
aus Twielenfleth/Stade

Göttingen 1966

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

D 7

Referent: Professor Dr. H. Brockmann
Korreferent: Professor Dr. W. Lüttke

Tag der mündlichen Prüfung: 12.5.66

Die vorliegende Arbeit wurde im Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen in der Zeit von März 1964 bis Februar 1966 durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,
Herrn Professor Dr. Hans Brockmann,
danke ich für wertvolle Anregungen
und für die großzügige Unterstützung
dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

THEORETISCHER TEIL	Seite
I. Einleitung	1
II. Actinomycin Z_1	6
1. Vorbemerkungen	6
2. Die Meerwein-Ponndorf-Reduktionsprodukte von Actinomycin Z_1	9
a) Actinomycin Z_1-I; Actinomycin Z_1-II	9
b) Die Acetate von Actinomycin Z_1, Actinomycin Z_1-I und Actinomycin Z_1-II	15
c) Die Actinomycine Z_1-III, Z_1-IV und Z_1-V	20
3. Die Oxydationsprodukte von Actinomycin Z_1	22
a) Darstellung und Isolierung	22
b) Das "gelbe Oxydationsprodukt" des Actinomycins Z_1	23
c) Die "sauren Oxydationsprodukte" des Actinomycins Z_1	26
4. Die Actinomycin Z_1-Säuren	30
5. Beitrag zur Sequenzanalyse des Actinomycins Z_1	45
III. Die Z_S-Actinomycine	52
1. Vorbemerkungen	52
2. Actinomycin Z_S-Gemisch	52
3. Actinomycin Z_5	55
4. Die Actinomycine Z_4, Z_3 und Z_2	59
a) Actinomycin Z_4	59
b) Actinomycin Z_3	62
c) Actinomycin Z_2	64
IV. Die Z_0-Actinomycine	67
V. Der Bauplan der Z-Actinomycine	70
VI. Darstellung der Vergleichsaminosäuren	73
1. 4-Hydroxy-5-methylprolin	73
2. 3-Methylprolin; 4-Methylprolin	78
VII. Zusammenfassung der Ergebnisse	81

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE Seite

I. Allgemeines 85

II. Die Meerwein-Ponndorf-Reduktionsprodukte von Actinomycin Z_1 86

III. Actinomycin Z_1-Säuren 90

IV. Die Oxydationsprodukte von Actinomycin Z_1 93

V. Seco-actinomycine Z_1 95

VI. Die Actinomycine Z_2, Z_3, Z_4 und Z_5 96

VII. Die Z_0-Actinomycine 104

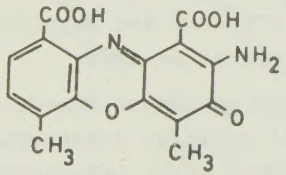
VIII. Synthesen von Vergleichsaminosäuren 105

Literaturverzeichnis 110

I. Einleitung

Die Actinomycine[1,2] sind gelb-rote, kristalline Antibiotica, die von verschiedenen Streptomyces-Arten produziert werden. Da sie sehr giftig sind[3], haben sie als Antibiotica keine Verwendung gefunden. Medizinisches Interesse bekamen sie erst, als Chr. Hackmann[4-6] im Tierversuch ihre tumorhemmende Wirkung erkannte und auch bei menschlichen Tumoren eine cytostatische Wirkung nachgewiesen werden konnte, so daß die Actinomycine heute mit Erfolg zur Behandlung von Lymphtumoren (Hodgkinsche Krankheit) Verwendung finden. In letzter Zeit werden sie, da sie spezifisch die DNS-abhängige RNS-Synthese blockieren, zur Untersuchung vieler biochemischer Vorgänge verwandt.

Die Aufklärung der chemischen Struktur der Actinomycine wurde 1951 von H. Brockmann und Mitarbeitern[7] begonnen. Es zeigte sich, daß die natürlichen Actinomycinpräparate Gemische mehrerer Actinomycine sind, die sich durch Gegenstromverteilung[8] oder Verteilungschromatographie[9-11] trennen lassen. Sie enthalten alle den gleichen Chromophor[12,13], das Actinocin (1), das säureamidartig mit zwei aus je fünf Aminosäurebausteinen bestehenden Peptidlactonringen verbunden ist. Unterschiede innerhalb der Actinomycine finden sich nur auf Grund verschiedener oder verschiedenartig angeordneter Aminosäurebausteine.



1

Die bisher aus Streptomyces-Kulturen isolierten Actinomycingemische kann man nach den Hauptactinomycinen in vier Gruppen einteilen:

1. I-Actinomycine, die hauptsächlich aus Actinomycin C_1 bestehen;
2. C-Actinomycine mit den Hauptkomponenten C_2 und C_3 und den in kleiner oder sehr kleiner Menge vorhandenen Actinomycinen C_1, C_{2a} und C_0;
3. X-Actinomycine mit der Hauptkomponente X_2 und vielen Nebenkomponenten (C_1, X_3, X_4, X_{1a}, $X_{0\beta}$, $X_{0\delta}$ und $X_{0\alpha}$;
4. Z-Actinomycine.

Die Untersuchung auch der in geringster Menge in Actinomycingemischen vorhandenen Nebenactinomycine sollte einmal zeigen, in welchem Ausmaß die Zelle das Molekül variieren kann. Andererseits erhoffte man sich Rückschlüsse darauf, wie die bakteriostatischen, cytostatischen und toxischen Eigenschaften der Actinomycine sich mit der Struktur des Peptidteils ändern. Schließlich kann man aus der Struktur der Haupt-und Nebenactinomycine Rückschlüsse auf ihre Bildung im Organismus ziehen.

Auf Grund der Ergebnisse bei der Strukturermittlung der I-, C- und X-Gemische stellten H. Brockmann und J. H. Manegold[14,15] einen Bauplan der Actinomycine auf (Abbild. 1) und zeigten damit, daß Variationen vor allem an den Resten R_3, R_4, R_5 und R_6 möglich sind, in denen D-Valin durch D-allo-Isoleucin und L-Prolin durch L-4-Oxoprolin, L-4-Hydroxyprolin oder Sarkosin ersetzt werden kann.

Bei der Untersuchung der Struktur der Peptidlactonringe traten vor allem folgende Schwierigkeiten auf:

1. Das direkt am Chromophor gebundene Threonin erwies sich als so unbeständig, daß bei normaler salzsaurer Hydrolyse über 50 % zerstört werden. Erst durch reduzierende Hydrolyse mit Jodwasserstoffsäure in Gegenwart von rotem Phosphor nach H. Brockmann, H. Gröne und J. Timm[16] und damit durch Überführung des Threonins in Aminobuttersäure oder auch durch vorherige katalytische Hydriereng des Chromophors nach H. Brockmann und J. H. Manegold[14, 17] erhielt man Threoninwerte über ein Mol.

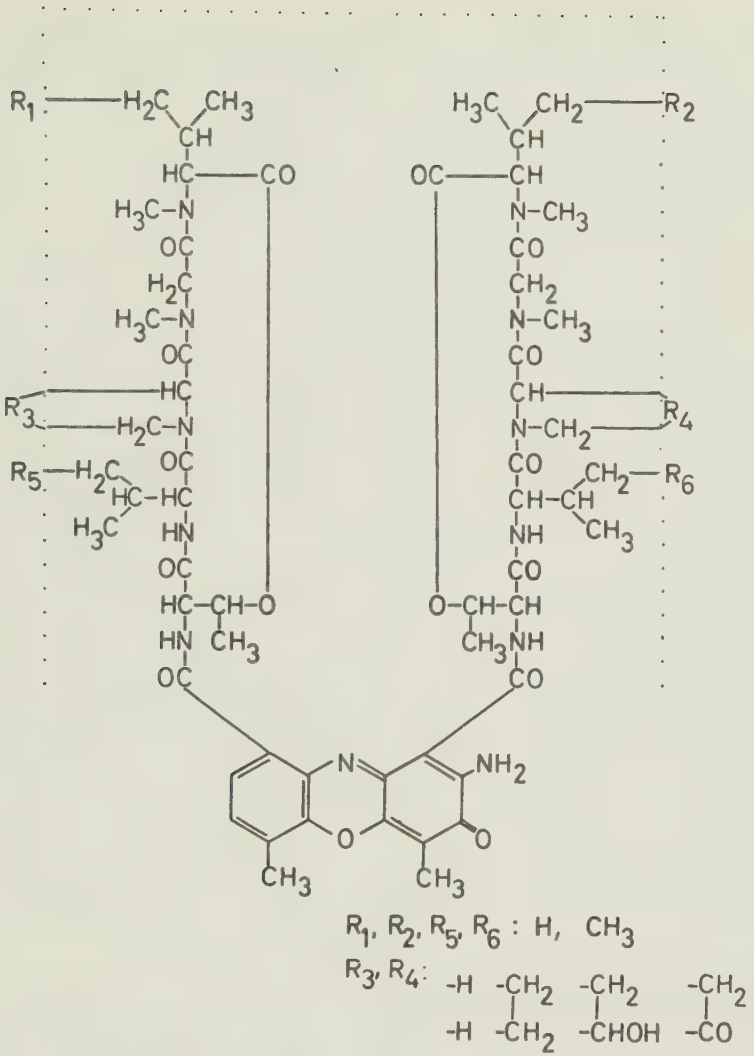


Abbildung 1

Bauplan der Actinomycine

2. Das Vorkommen von seltenen und unbeständigen Aminosäuren, wie z. B. des 4-Oxoprolins im Actinomycin X_2[14,18], das erst nach Überführung in Derivate sicher nachgewiesen werden konnte, erforderte neue Identifizierungsmethoden.

   Weiterhin lassen sich die in Actinomycinen häufigen N-Methylaminosäuren quantitativ sehr schlecht bestimmen, so daß erst neue Verfahren zu ihrem Nachweis ausgearbeitet werden mußten.

3. Die größten Schwierigkeiten bereiteten die Sequenzanalyse und vor allem die Verteilung der Aminosäuren bei den aniso-Actinomycinen. Hier stellt sich die Frage, wie sich der Unterschied des benzoiden Teils des Actinocins (1) vom chinoiden Teil auf die Peptidlactonringe auswirkt. Ausgehend von den verschiedenen Actinomycinsäuren konnten von W. Sunderkötter[19] und G. Döring[20] die ersten Angaben über die Verteilung von D-Valin und D-allo-Isoleucin im Actinomycin C_2, sowie von 4-Oxoprolin im Actinomycin X_2 gemacht werden, die sicherstellten, daß bei den aniso-Actinomycinen C_2 und X_2 keine Isomerengemische, sondern einheitliche Verbindungen vorliegen.

Im Jahre 1958 veröffentlichten W. Keller-Schierlein und Mitarbeiter[21] eine Arbeit über ein bis dahin nicht bekanntes Actinomycingemisch (Actinomycin Z), das sie aus Kulturen von Str. fradiae isolierten und das sie in die Komponenten Z_0, Z_1, Z_2, Z_3, Z_4 und Z_5 auftrennen konnten. Es unterschied sich von allen bekannten Actinomycinen dadurch, daß es N-Methylalanin, eine bis dahin in der Natur nicht gefundene Aminosäure, enthielt. Prolin oder prolinanaloge Bausteine wurden nicht gefunden.

Proben dieser Z-Actinomycine, die im Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen untersucht wurden, zeigten, daß Actinomycin Z_1 mit einem von H. Brockmann, J. H. Manegold und W. Frommer isolierten Actinomycin, dem Actinomycin H_5[14,17], identisch ist.

Im Actinomycin Z_1 treten die oben allgemein formulierten Schwierigkeiten bei der Analyse des Peptidteils in verstärktem Maße auf.

So findet man bei der quantitativen Aminosäureanalyse nach H. Brockmann und J. H. Manegold[17] nur sieben der durch Molekulargewicht und Elementaranalysen geforderten zehn Aminosäuren. Da an drei Stellen der beiden Peptidlactonringe des Actinomycins Z_1 unterschiedliche Aminosäuren eingebaut sind, stellt sich die Frage, ob Actinomycin Z_1 ein nicht trennbares Gemisch aus acht verschiedenen Actinomycinen ist oder ob die Zelle speziell eine dieser acht Möglichkeiten aufbaut.

Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die fehlenden Aminosäurebausteine des Actinomycins Z_1 zu finden und damit eine den anderen bekannten Actinomycinen analoge Strukturformel aufzustellen, die dann durch Sequenzanalyse bestätigt werden sollte. Es war daher nötig, nach Verfahren zu suchen, die unbeständigen Aminosäuren direkt oder indirekt nachzuweisen. Da die modernen physikalisch-chemischen Methoden, wie NMR-Spektroskopie und Massenspektroskopie, wegen der Größe des Moleküls keine Verwendung finden konnten, war man auf klassische Abbauverfahren angewiesen.

Weiterhin sollten Möglichkeiten zur Auftrennung der Nebenactinomycine der Z-Reihe gesucht und einzelne Vertreter charakterisiert werden.

II. Actinomycin Z_1

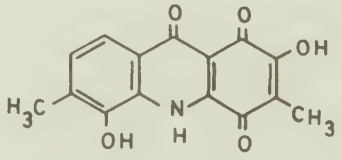
1. Vorbemerkungen

Das aus Kulturfiltraten des Str. fradiae Stammes ETH 20675 isolierte Actinomycin Z besteht aus mindestens 12 verschiedenen Actinomycinen, die sich durch Verteilungschromatographie trennen lassen (s. Abschnitte III und IV).

Eine Abtrennung der Hauptkomponente, des Actinomycins Z_1, gelingt jedoch besser durch Säulenchromatographie an Aluminiumoxid IV (stand. nach H. Brockmann). Beim Nachwaschen mit Essigester bilden sich auf der Säule drei Zonen:

1. Die erste mit Essigester eluierbare Fraktion enthält ein Gemisch aus sieben verschiedenen Actinomycinen ("schnelle Z-Actinomycine"; s. Abschnitt III).
2. Die zweite mit Essigester eluierbare Zone enthält fast reines Actinomycin Z_1, das nach nochmaliger Chromatographie an Aluminiumoxid IV von den letzten Verunreinigungen befreit wird und aus Benzol leicht kristallisiert.
3. Eine am oberen Rand der Säule zurückbleibende Zone, deren Inhaltsstoffe mit Methanol eluiert werden können, enthält vier Actinomycine (Z_0-Fraktion; s. Abschnitt IV).

Das so erhaltene reine Actinomycin Z_1 läßt sich in äthanolischer Lösung mit wäßr. Bariumhydroxid zum Despeptidoactinomycin (2) abbauen. Dieser Abbau und das anderen Actinomycinen völlig analoge UV-Spektrum beweisen, daß der Chromophor des Actinomycins Z_1 Actinocin (1) ist.



2

Quantitative Aminosäureanalysen zeigen, daß Actinomycin Z_1 1 Mol Threonin, 2 Mol Valin, 2 Mol Sarkosin, 1 Mol N-Methylvalin und 1 Mol N-Methylalanin enthält. Prolinbausteine und die zweite threoninanaloge Komponente, die analog dem Bauplan der Actinomycine (Abbild. 1) noch fehlen, wurden zunächst nicht gefunden.

Bei gleichem Chromophor läßt sich aus der spezifischen Extinktion des Actinomycins Z_1 (α_{442} = 19.21) durch Vergleich mit der molaren Extinktion anderer Actinomycine (ε_{442} = 25000 ± 400) das Molekulargewicht berechnen (1300 ± 20). Mit den Elementaranalysen ergibt sich eine Summenformel von

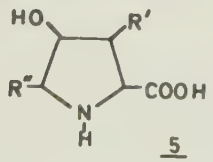
$$C_{61-63}\ H_{84-88}\ N_{12}\ O_{19} \cdot \qquad (3)$$

Eliminiert man den Chromophor und die bekannten Aminosäurereste, so erhält man als Summenformel des noch unbekannten Teils

$$C_{15-17}\ H_{22-26}\ N_3\ O_7 \cdot \qquad (4)$$

Daß der unbekannte Rest drei Stickstoffatome enthält, deutet daraufhin, daß im unbekannten Teil des Actinomycins Z_1 ebenfalls drei Aminosäurebausteine enthalten sind, die bei der sauren Totalhydrolyse entweder zerstört werden oder aber mit den normalen Entwicklungsreagentien nicht reagieren.

Einen ersten Hinweis auf die Struktur eines dieser drei Aminosäurereste fand J. H. Manegold[14,17], als er im Hydrolysat des nach Meerwein-Ponndorf reduzierten Actinomycins Z_1 eine Aminosäure entdeckte, die sich durch ihre Farbreaktion mit Isatin und p-Dimethylaminobenzaldehyd eindeutig als ein Hydroxyprolin zu erkennen gab, sich aber vom 4-Hydroxyprolin durch größeren R_F-Wert im Papierchromatogramm unterschied. Er folgerte daraus,



5

a : R' = H R" = CH_3

b : R' = CH_3 R" = H

daß es sich um ein entweder in 3- oder in 5-Stellung methyliertes 4-Hydroxyprolin (5) handelt.

In meiner Diplom-Arbeit konnte ich diese Aminosäure durch Vergleich mit synthetischen Präparaten als 4-Hydroxy-5-methylprolin identifizieren[22] und damit nachweisen, daß im Actinomycin Z_1 das unbeständige 4-Oxo-5-methylprolin enthalten ist. Eine weitere Bestätigung für die Struktur dieser Aminosäure erhielt ich, als ich nach katalytischer Reduktion des Actinomycins Z_1 mit Platinoxid in Eisessig 5-Methylprolin im Hydrolysat nachweisen konnte.

Auf die nähere Untersuchung der Reaktionsprodukte der Meerwein-Ponndorf-Reduktion, die Beweise für die Konfiguration dieser Aminosäure liefert, soll zunächst eingegangen werden.

2. Die Meerwein-Ponndorf-Reduktionsprodukte von Actinomycin Z_1

a) Actinomycin Z_1-I; Actinomycin Z_1-II

Erhitzt man Actinomycin Z_1 mit Aluminiumisopropylat in Isopropanol/Benzol 12 Stdn. am Rückfluß und zerstört überschüssiges Aluminiumisopropylat mit 2n H_2SO_4, so erhält man ein Reaktionsprodukt, in dem papierchromatographisch fünf Zonen, zwei dicht am Startkreis liegende Hauptzonen (Actinomycine Z_1-I/Z_1-II; nach steigendem R_F-Wert durch römische Ziffern gekennzeichnet) und drei schwache Nebenzonen mit größeren R_F-Werten (Actinomycine Z_1-III/Z_1-IV/Z_1-V; nach steigendem R_F-Wert durch römische Ziffern gekennzeichnet) nachzuweisen sind. Die Actinomycine Z_1-III, Z_1-IV und Z_1-V lassen sich an einer Aluminiumoxidsäule durch Eluieren mit Aceton von dem erst mit Methanol eluierbaren Actinomycin Z_1-I/II-Gemisch abtrennen. Die Auftrennung dieses Gemisches gelingt an einer Cellulosepulversäule im System Butylacetat - Dibutyläther - Butanol - 5 proz. wäßr. Kresotinat (6:1:1:8) und führt in annähernd gleicher Ausbeute zu den aus wenig Benzol/Cyclohexan gut kristallisierenden reinen Actinomycinen Z_1-I und Z_1-II.

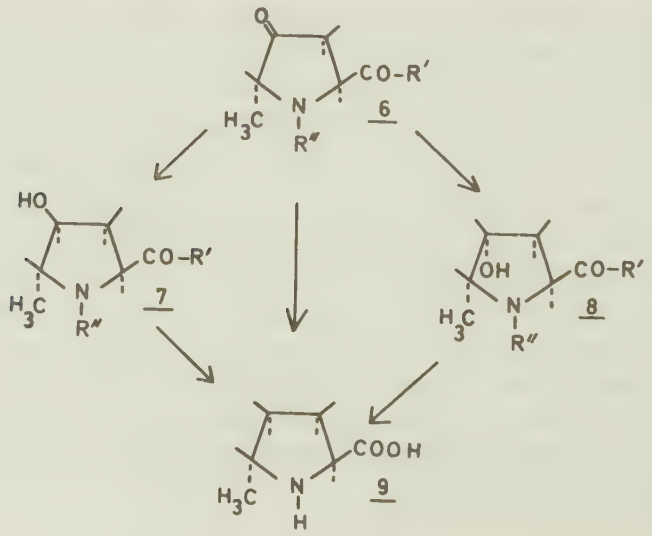
Beide stimmen innerhalb der Fehlergrenzen in ihren Analysenzahlen und spezifischen Extinktionen miteinander und mit Actinomycin Z_1 überein. Sie sind im Gegensatz zu Actinomycin Z_1 antibiotisch unwirksam. Ihr R_F-Wert ist noch geringer als der von Actinomycin $X_{0\alpha}$. Beide bilden je ein Triacetat (s. Abschnitt 2b).

Die quantitative Aminosäurebestimmung zeigt, daß in beiden die schon im Actinomycin Z_1 vorhandenen Aminosäuren in gleicher Menge vorkommen. Zusätzlich findet man jedoch in beiden je ein Mol 4-Hydroxy-5-methylprolin. Untersucht man die Wanderungsgeschwindigkeiten der in Actinomycin Z_1-I und Z_1-II gefundenen 4-Hydroxy-5-methylproline im Hochspannungspherographen, so stelltman fest, daß das im Hydrolysat von Z_1-II vorhandene bei pH 1.9 und 2200V/60-70 mA eine größere Wanderungsgeschwindigkeit hat als das im Hydrolysat von Z_1-I gefundene.

Da sich im Actinomycin Z_1-I und im Actinomycin Z_1-II nach reduzierender Hydrolyse mit Jodwasserstoffsäure nach H. Brockmann, H. Gröne und J. Timm[16] 5-Methylprolin (9) nachweisen läßt, das ebenfalls bei katalytischer Hydrierung des Actinomycins Z_1 mit Platinoxid in Eisessig und anschließender Hydrolyse gefunden wird, müssen also bei der Reduktion nach Meerwein-Ponndorf zwei 4-Hydroxy-5-methylproline (7 und 8) aus 4-Oxo-5-methylprolin (6) entstehen, die beide bei nachfolgender Reduktion in das gleiche 5-Methylprolin (9) übergehen.

Th. Wieland und U. Wintermeyer[23] hatten gezeigt, daß allo-4-Hydroxyprolin im Pherographen eine größere Wanderungsgeschwindigkeit hat als 4-Hydroxyprolin (s. Abbild. 2). Analoge Versuche mit dem Hydrolysat von Actinomycin Z_1-I und Z_1-II zeigten, daß die Differenz der Wanderungsgeschwindigkeiten zwischen allo-4-Hydroxyprolin und 4-Hydroxyprolin ebenso groß ist wie die der in Z_1-I und Z_1-II gefundenen 4-Hydroxy-5-methylproline.

Die Meerwein-Ponndorf-Reduktion des Actinomycins Z_1 verläuft also sterisch nicht einheitlich, sondern führt zu einem Actinomycingemisch, in dessen 4-Hydroxy-5-methylprolinkomponente einmal



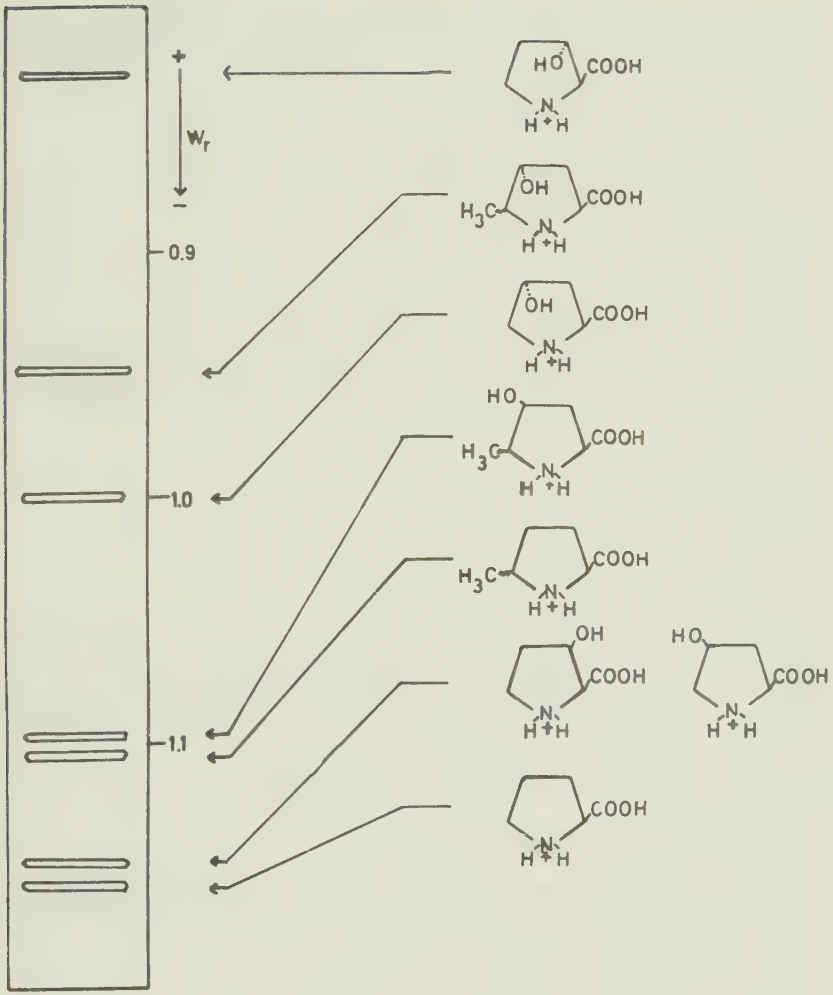
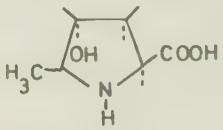


Abbildung 2

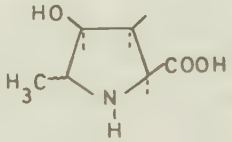
Relative Wanderungsgeschwindigkeiten (W_r) von Iminocarbonsäuren im Hochspannungspherogramm (Laufzeit: 2 Stdn.; pH 1.9; 2200 V/60-70 mA) bezogen auf 4-Hydroxyprolin (W_r = 1)

eine dem allo-4-Hydroxyprolin analoge Struktur (7; Actinomycin Z_1-II) und zum anderen eine dem 4-Hydroxyprolin analoge Struktur (8; Actinomycin Z_1-I) vorliegt. Beide gehen bei reduzierender Hydrolyse in das gleiche 5-Methylprolin (9) über.

Eine Bestätigung für diese Befunde erhielt ich, als es mir gelang, trans-4-Hydroxy-5-methylprolin (10) neben der bis dahin ausschließlich dargestellten cis-Verbindung (11) herzustellen[22] (s. Abschnitt V) und mit den in Actinomycin Z_1-I und Z_1-II gefundenen Iminohydroxysäuren pherographisch zu vergleichen. Danach ist die Wanderungsgeschwindigkeit des in Actinomycin Z_1-I gefundenen 4-Hydroxy-5-methylprolins identisch mit der von 10 und die des in Actinomycin Z_1-II gefundenen identisch mit 11.

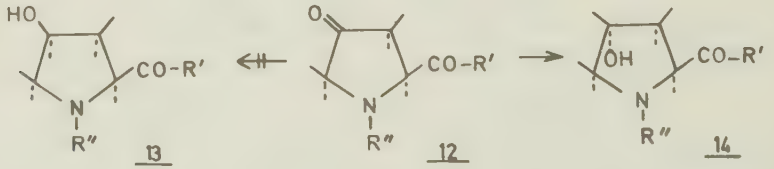


10



11

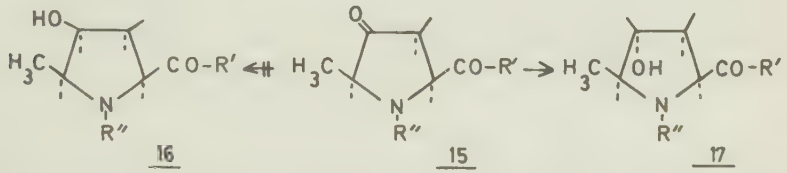
Aus Actinomycin X_2 entsteht bei der Meerwein-Ponndorf-Reduktion ausschließlich Actinomycin $X_{0\beta}$ mit 4-Hydroxyprolin im Molekül[14] (14). Die Reduktion verläuft hier also im Gegensatz zum Actinomycin Z_1 sterisch einheitlich und führt nicht zum Actinomycin $X_{0\delta}$ mit allo-4-Hydroxyprolinrest (13) im Molekül.



13 12 14

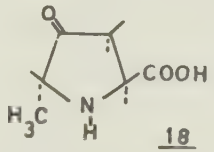
Daß im Falle des Actinomycins Z_1 ein Gemisch der Actinomycine Z_1-I und Z_1-II mit den Aminosäurebausteinen 8 und 7 entsteht, ist wohl darauf zurückzuführen, daß die Reduktion deshalb nicht ausschließlich von 6 nach 8 abläuft, weil die Methylgruppe an C_5 im 4-Oxo-5-methylprolinrest trans-ständig zur Carboxygruppe an C_2 steht (6). Stände sie in cis-Stellung (15), so müßte die

Reduktion wohl aus sterischen Gründen ebenso wie im Actinomycin X_2 ausschließlich zum Actinomycin Z_1-I mit trans-ständiger Hydroxygruppe (17) und nicht zum anderen Diastereomerenpaar (16) führen.



16 15 17

Demnach kann mit einiger Sicherheit auch die Konfiguration der Methylgruppe an C_5 angegeben werden und das im Actinomycin Z_1 vorhandene 4-Oxo-5-methylprolin besitzt die Struktur 18.

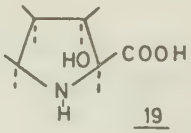


18

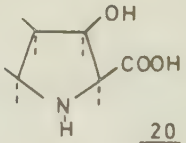
Um auch noch die letzten Zweifel an der Struktur der 4-Hydroxy-5-methylproline auszuschließen - es konnte möglich sein, daß die 3-Methylderivate des 4-Hydroxyprolins pherographisch und chromatographisch von den 5-Methylderivaten nicht zu trennen sind - wurden 3- und 4-Methylprolin synthetisiert (s. Abschnitt VI,2). Es stellte sich heraus, daß sie sich eindeutig chromatographisch vom 5-Methylprolin unterscheiden lassen, dessen R_F-Wert mit dem aus 6, 7 und 8 erhaltenen Methylprolin 9 übereinstimmt. Damit ist die Stellung der Methylgruppe im 4-Oxo-5-methylprolinrest des Actinomycins Z_1 nochmals bestätigt.

Um noch auf einem anderen Weg die Stellung der Oxogruppe an C_4 von 18 zu beweisen, wurden Ergebnisse von J. C. Sheehan und J. G. Whitney[24] herangezogen. Sie hatten gezeigt, daß 3-Hydroxyprolin (19) und allo-3-Hydroxyprolin (20) sich ebenfalls im Hochspannungspherogramm trennen, daß jedoch die Abstände zwischen beiden fast doppelt so groß sind wie die zwischen

4-Hydroxyprolin und allo-4-Hydroxyprolin (s. Abbild. 2). Analog sollten sich 3-Hydroxy-5-methylprolin und allo-3-Hydroxy-5-methylprolin verhalten.



19



20

Wären die in Actinomycin Z_1-I und Actinomycin Z_1-II enthaltenen Hydroxy-methylproline 3-Hydroxyverbindungen, sollte die Differenz der Wanderungsgeschwindigkeiten auch doppelt so groß sein wie bei 4-Hydroxy- und allo-4-Hydroxyprolin. Die Abstände sind jedoch halb so groß und entsprechen völlig den 4-Hydroxyprolinen. Damit ist mit Sicherheit die 3-Stellung ausgeschlossen.

Da der quantitativen Aminosäurebestimmung nach Actinomycin Z_1-I und Actinomycin Z_1-II je ein Mol 4-Hydroxy-5-methylprolin enthalten, muß Actinomycin Z_1 ein Mol 4-Oxo-5-methylprolin enthalten, womit von den drei fehlenden Aminosäuren des Actinomycins Z_1 eine identifiziert ist.

Wie oben gezeigt, war die Summenformel des noch unbekannten Teils des Actinomycins Z_1

$$C_{15-17}\ H_{22-26}\ N_3\ O_7\ \cdot \qquad (5)$$

Zieht man von ihr die Summenformel des 4-Oxo-5-methylprolinrestes ab ($C_6H_7NO_2$), so bleibt für den nunmehr noch unbekannten Rest die Summenformel

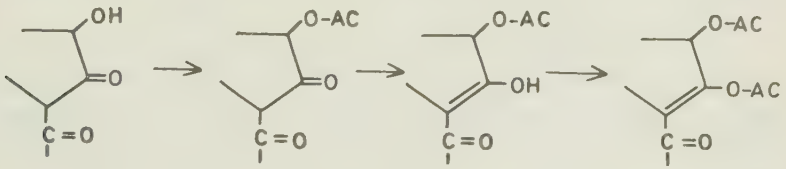
$$C_{9-11}\ H_{15-19}\ N_2\ O_5\ \cdot \qquad (21)$$

b) Die Acetate von Actinomycin Z_1, Actinomycin Z_1-I und Actinomycin Z_1-II

Actinomycin Z_1 läßt sich mit Acetanhydrid/Pyridin (2:1) bei Raumtemperatur je nach den Reaktionszeiten in ein Mono- oder ein Diacetat überführen[25]. Das Monoacetat wird in 1 Stde. gebildet, wohingegen die Bildung des Diacetates erst nach einer Reaktionsdauer von 100 Stdn. beendet ist.

In meiner Diplomarbeit hatte ich zur Erklärung der unterschiedlichen Bildungsgeschwindigkeit der Actinomycin Z_1-acetate drei Möglichkeiten diskutiert:

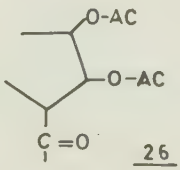
1. Die zweite Hydroxygruppe ist sterisch sehr behindert, wodurch ihre langsame Acetylierung zustande kommt.
2. Die Bildung des Diacetates wird durch das Monoacetat erschwert, d. h. die beiden Hydroxygruppen sind unmittelbar benachbart. In diesem Falle müßten allerdings zwei Monoacetate gefunden werden, was nicht beobachtet wurde.
3. Die Bildung des Diacetates setzt erst nach Enolisierung einer Oxogruppe ein, z. B. nach 22 - 25.



22 23 24 25

Für diese dritte Möglichkeit sprechen folgende Befunde:

a) Das Diacetat enthält außer dem reversibel reduzierbaren Chromophor eine zweite mit Titan(III)-chlorid reduzierbare Gruppe (Reduktion des Enoldiacetates 25 zum Diacetat 26).



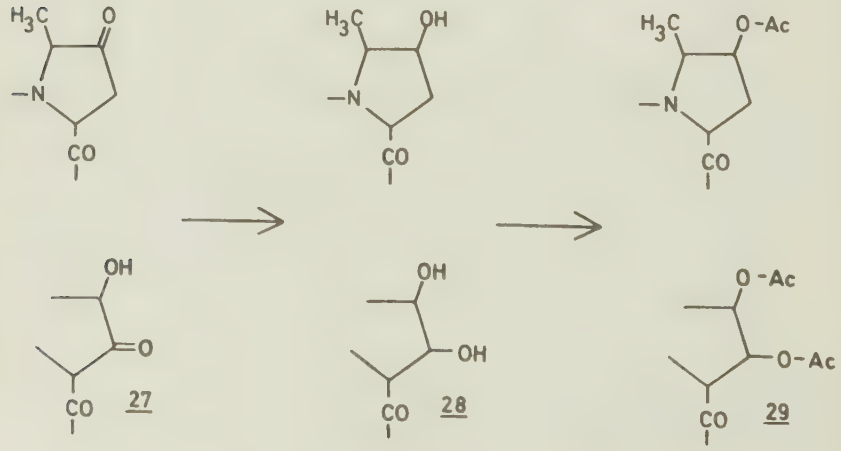
26

b) Bei der katalytischen Reduktion des Actinomycin Z_1-diacetates werden sofort 2 Mol Wasserstoff verbraucht, wohingegen vom Actinomycin Z_1 nur 1 Mol Wasserstoff aufgenommen wird. Auch dies könnte auf Hydrierung des Enoldiacetates 25 zurückzuführen sein.

Die Bestätigung für eine der drei Möglichkeiten hoffte ich durch Acetylierung der Meerwein-Ponndorf-Reduktionsprodukte des Actinomycins Z_1 (Actinomycin Z_1-I und Actinomycin Z_1-II) zu erhalten. In ihnen ist durch Reduktion des 4-Oxo-5-methylprolinrestes eine weitere acetylierbare Hydroxygruppe entstanden.

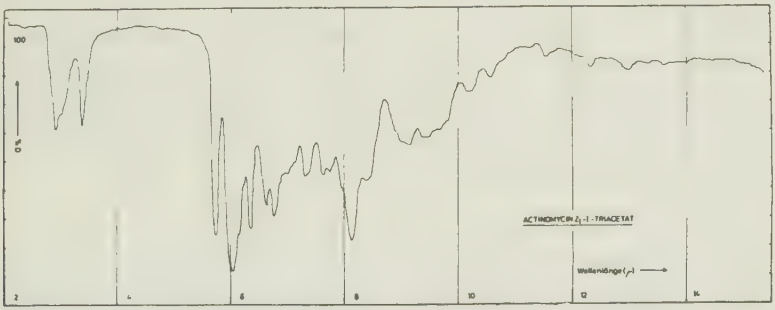
Träfe Fall 1 zu, so müßte durch Acetylierung der beiden Reduktionsprodukte ein Diacetat und ein Triacetat erhalten werden. Das gleiche gilt für Fall 2; denn durch Reduktion der Oxogruppe in einem bekannten Baustein des Actinomycins Z_1 dürften sich die sterischen Verhältnisse im noch unbekannten Teil kaum verändern.

Bei Fall 3 müßte man ein Triacetat erhalten; denn hier wäre durch Reduktion des Hydroxy-oxorestes 23 eine 1.2-Diolgruppierung entstanden, bei der die unterschiedlich schnelle Acetylierbarkeit aufgehoben ist (27 - 29).

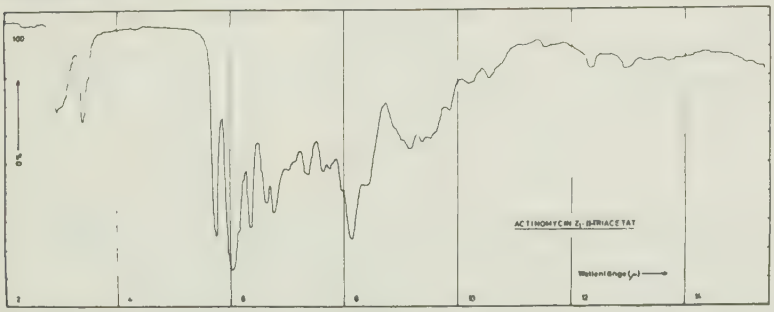


Behandelt man Actinomycin Z_1-I und Actinomycin Z_1-II mit Acetanhydrid/Pyridin (2:1) neun Stunden, also unter Bedingungen, bei denen Actinomycin Z_1 noch vorwiegend Monoacetat neben wenig Diacetat liefert, so erhält man nur je ein Triacetat. Actinomycin Z_1-I-triacetat und Actinomycin Z_1-II-triacetat unterscheiden sich im Papierchromatogramm im System Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. wäßr. Kresotinat (3:1:4), wobei letzteres den größeren R_F-Wert besitzt.

Im IR-Spektrum besitzt die C-O-Streckfrequenz der Acetate bei 8.15μ (1227 cm^{-1}) die dreifache Maximalintensität wie die von Actinomycin Z_1-monoacetat und ist neben den O-Acetylbestimmungen ein weiterer Beweis für das Vorliegen von drei Acetylgruppen.



Abbild. 3 IR-Spektrum von Actinomycin Z_1-I-triacetat (KBr)



Abbild. 4 IR-Spektrum von Actinomycin Z_1-II-triacetat (KBr)

Diese Beobachtungen schließen also die Fälle 1 und 2 aus und geben eine weitere Stütze für die Formulierung nach Fall 3. Es wird also bei der Meerwein-Ponndorf-Reduktion von Actinomycin Z_1 nicht nur die Oxogruppe im 4-Oxo-5-methylprolinrest reduziert, sondern des weiteren eine zweite Oxogruppe, die unter den Bedingungen der Acetylierung mit Acetanhydrid/Pyridin (2:1) enolisierbar ist.

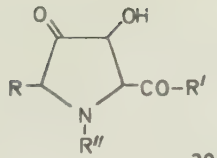
Für diese Befunde spricht auch, daß die spezifische Drehung, die im Actinomycin Z_1 besonders hoch liegt ($[\alpha]_D^{20}$: $- 488 \pm 6^o$; c = 0.2 in Methanol), nach der Reduktion fast auf 0^o zurückgegangen ist. Eine Racemisierung könnte während der Reduktion mit Aluminiumisopropylat nicht nur an C_5 des Oxomethylprolins, sondern auch an den anderen Reduktionsstellen einsetzen.

Um nähere Anhaltspunkte über die Struktur dieser Hydroxy-oxokomponente des Actinomycins Z_1 zu erhalten, muß man sich noch einmal den Bauplan der Actinomycine (Abbild. 1) vergegenwärtigen. Nimmt man an, daß Actinomycin Z_1 ebenso aufgebaut ist wie alle anderen Actinomycine, so müßte in dem noch unbekannten Rest des Actinomycins Z_1 mit der Summenformel

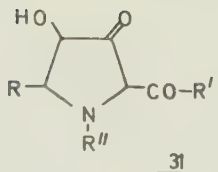
$$C_{9-11}\ H_{15-19}\ N_2\ O_5 \qquad (21)$$

noch eine Prolinkomponente und eine Aminohydroxysäure vorhanden sein. Da man außer den Oxoprolinen bis jetzt keine gegen Säureeinwirkung unbeständigen Prolinderivate gefunden hat und diese nach Reduktion leicht als Hydroxyproline nachgewiesen werden können, ist anzunehmen, daß die zweite prolinanaloge Komponente mehrere sauerstoffhaltige Gruppen trägt. Baut man das durch Acetylierungsversuche von Actinomycin Z_1 und seinen Reduktionsprodukten nachgewiesene Hydroxy-oxo-schema in einen Prolinring ein, so kommt man zu den Möglichkeiten 30 - 35. 32, 33, 34 und 35 kann man ausschließen, da solche Verbindungen sehr leicht in die entsprechenden, durchaus beständigen Glutaminsäurederivate überführt werden können, was nicht beobachtet wurde.

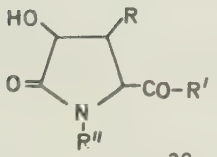
Es blieben also nur die Strukturen 30 und 31 übrig. Derartige Prolinderivate dürften auch im reduzierten Zustand 36 sehr unbeständig sein, da sie leicht durch Dehydratisierung in den



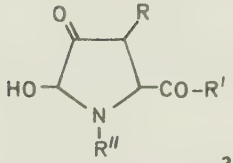
30



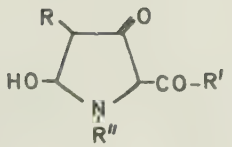
31



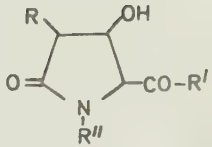
32



33

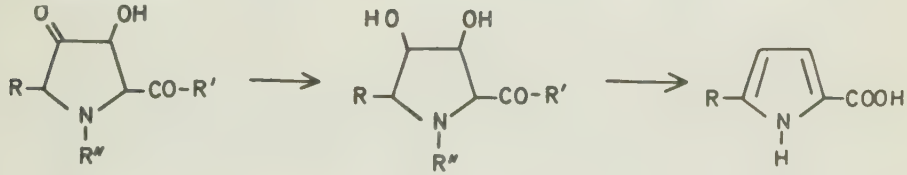


34



35

Pyrrolcarbonsäurerest 37 übergehen sollten, der bekanntlich unter sauren Bedingungen leicht unter Bildung harziger Produkte polymerisiert.



30 36 37

Einen ersten Anhaltspunkt für die Natur dieses zweiten Prolinrestes im Actinomycin Z_1 glaubte ich bei der Untersuchung der bei der Meerwein-Ponndorf-Reduktion des Actinomycins Z_1 erhaltenen Nebenprodukte (Actinomycine Z_1-III, Z_1-IV und Z_1-V) gefunden zu haben.

c) Die Actinomycine Z_1-III, Z_1-IV und Z_1-V

Bei der Reduktion von Actinomycin Z_1 mit Aluminiumisopropylat entstehen neben Actinomycin Z_1-I und Actinomycin Z_1-II geringe Mengen von Nebenprodukten (14 mg aus 500 mg Z_1) mit größeren R_F-Werten. Diese Nebenprodukte trennen sich im System Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. wäßr. Kresotinat (3:1:4) in drei Zonen auf, deren Inhaltsstoffe das gleiche UV-Spektrum zeigen wie Actinomycin Z_1 und deshalb ebenfalls als Actinomycine zu bezeichnen sind (Z_1-III, Z_1-IV und Z_1-V; nach steigendem R_F-Wert durch römische Ziffern gekennzeichnet).

Auch bei der Reduktion von Actinomycin X_2 nach Meerwein-Ponndorf entstehen neben Actinomycin $X_{0ß}$ Spuren von Nebenprodukten, die mit Actinomycin C_1 identisch sind, in denen also der 4-Oxoprolinrest zum Prolinrest reduziert wurde.

Nimmt man analoges Verhalten beim Actinomycin Z_1 an, so müßte man in den Vorzonen 5-Methylprolin finden. Tatsächlich läßt sich im Hydrolysat von Actinomycin Z_1-V neben allen anderen bekannten Aminosäuren des Actinomycins Z_1 zusätzlich das geforderte 5-Methylprolin nachweisen.

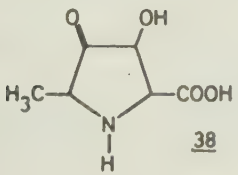
Im Hydrolysat von Actinomycin Z_1-IV fand ich Prolin und schloß daraus, daß die zweite Prolinkomponente ein unsubstituiertes Prolingerüst enthält. Um diesen Befund zu bestätigen, führte ich quantitative Aminosäurebestimmungen von Actinomycin Z_1-I und Actinomycin Z_1-II nach H. Brockmann, H. Gröne und J. Timm[16] durch. Unter diesen Bedingungen werden die Hydroxygruppen herausreduziert und man müßte neben einem Mol 5-Methylprolin ein Mol Prolin finden.

Überraschenderweise wurde jedoch kein Prolin, dafür aber 1.65 Mol 5-Methylprolin gefunden, d. h. auch die zweite Prolinkomponente des Actinomycins Z_1 enthält einen 5-Methylprolinrest. Die Herkunft des im Actinomycin Z_1-IV gefundenen Prolins ist vorläufig nicht zu erklären.

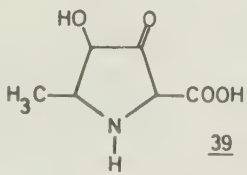
Faßt man die Befunde zusammen, die sich für die Struktur des zweiten Prolinbausteins ergeben, so kommt man zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Verbindung enthält ein 5-Methylprolingerüst.
2. Sie enthält eine enolisierbare Oxo- und eine Hydroxygruppe, wie sich aus der verschiedenen Acetylierungsgeschwindigkeit und aus Hydrierungsversuchen mit Actinomycin Z_1 und seinen Acetaten ergibt.
3. Die enolisierbare Oxogruppe wird nach Meerwein-Ponndorf-Reduktion zu einer Hydroxygruppe (selektive Acetylierbarkeit tritt nicht mehr auf).
4. Der nicht reduzierte und der reduzierte Prolinbaustein des Actinomycins Z_1 muß bei saurer und bei alkalischer Hydrolyse zu nicht identifizierbaren Produkten zersetzt werden.

Die beiden einzigen Verbindungen, die allen vier Punkten Rechnung tragen, sind 3-Hydroxy-4-oxo-5-methylprolin (38) und 3-Oxo-4-hydroxy-5-methylprolin (39). Der Verbindung 39 ist wegen leichterer Enolisierbarkeit der Vorzug zu geben.



38



39

Im Actinomycin Z_1 liegt also ein Prolinderivat mit 1.2-Hydroxy-oxo-struktur, in den Actinomycinen Z_1-I und Z_1-II mit 1.2-Diol-struktur vor. Beide müßten mit Perjodsäure unter Spaltung der C-C-Bindung reagieren. Auf diese Oxydationsversuche soll als nächstes eingegangen werden.

3. Die Oxydationsprodukte von Actinomycin Z_1

a) Darstellung und Isolierung

Behandelt man eine äthanolische Lösung von Actinomycin Z_1 (10^{-3} molar) mit wäßr. Perjodsäure 15 Stdn. bei Raumtemperatur und extrahiert anschließend die Reaktionsprodukte mit Chloroform, so erhält man ein Rohprodukt, das im Papierchromatogramm im System Butylacetat - Dibutyläther - Butanol - 5 proz. wäßr. Kresotinat (6:1:1:8) neben unverändertem Ausgangsprodukt fünf neue Zonen mit kleineren R_F-Werten zeigt.

Der Inhaltsstoff der am Startkreis zurückgebliebenen Zone mit kleinstem R_F-Wert läßt sich aus Chloroform mit wäßr. Natriumhydrogencarbonat ausschütteln und nach Ansäuern wieder mit Chloroform extrahieren. Dieser Stoff, der also saure Eigenschaften zeigt, ist in 30 proz. Ausbeute entstanden (s. Abschnitt 3b).

Die nicht mit Natriumhydrogencarbonat extrahierbare, neutrale Fraktion kann an einer Cellulosepulversäule im System Butylacetat - Dibutyläther - Butanol - 5 proz. wäßr. Kresotinat (6:1:1:8) in fünf Zonen aufgetrennt werden:

1. Der Inhaltsstoff der Zone mit größtem R_F-Wert ist unverändertes Actinomycin Z_1 (Ausbeute: 33.4 %).
2. Die Fraktion mit dem nächst kleineren R_F-Wert (4 % Ausbeute) ist ein rotbraunes Oxydationsprodukt mit verändertem Actinomycinchromophor, das nicht näher untersucht wurde.
3. Der Inhaltsstoff der dritten Zone (10 % Ausbeute), der im Chromatogramm eine leuchtend gelbe Farbe hat ("gelbes Oxydationsprodukt"), nur noch schwach Halochromie zeigt und antibiotisch wirksam ist, soll anschließend (s. Abschnitt 3a) ausführlich diskutiert werden.
4. Fraktion 2 - in 7 % Ausbeute entstanden - gibt Grünfärbung mit methanolischem Zinn(II)-chlorid und konnte durch chromatographischen Vergleich im System Butylacetat - Dibutyläther - Butanol - 5 proz. wäßr. Kresotinat (6:1:1:8) als Desamino-actinomycin Z_1 identifiziert werden.

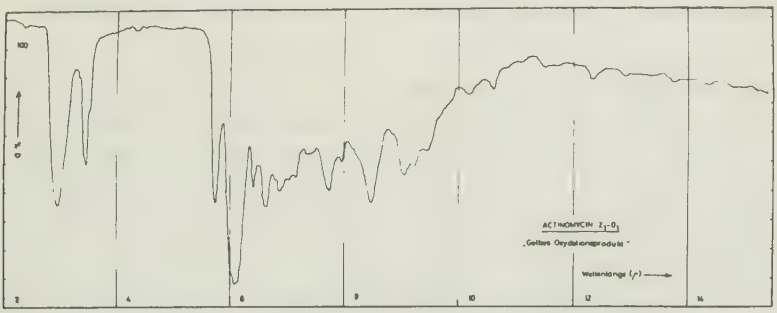
5. Fraktion 1 (Ausbeute 3.5 %) gibt ebenfalls Grünfärbung mit methanolischem Zinn(II)-chlorid, hat aber einen etwas geringeren R_F-Wert als Desaminoactinomycin Z_1. Es könnte sich um die Desaminoverbindung des "gelben Oxydationsproduktes" handeln.

b) Das "gelbe Oxydationsprodukt" des Actinomycins Z_1

Der Inhaltsstoff aus der dritten Zone schien mir aus zwei Gründen untersuchenswert:

1. Der Stoff ist antibiotisch bis zur Verdünnung 1 : 200000 gegen St. aureus wirksam, obwohl er einen gegenüber Actinomycin Z_1 veränderten Chromophor hat.
2. Untersuchungen mit anderen Actinomycinen zeigten, daß weder Actinomycin C_1 noch Actinomycin X_2 unter gleichen Reaktionsbedingungen ein ähnliches, leuchtend gelbes Produkt liefern. Lediglich nach Oxydation von Actinomycin $X_{0\delta}$ fand ich im Chromatogramm ein ähnliches Oxydationsprodukt.

Das "gelbe Oxydationsprodukt" ist in festem Zustand ein braungelbes Pulver vom Schmelzpunkt 245°. Es zeigt die gleichen Löslichkeitseigenschaften wie Actinomycin Z_1. Das IR-Spektrum ist fast identisch mit dem von Actinomycin Z_1; eine geringe Abweichung in der Intensität der Banden findet sich lediglich im Bereich zwischen 6 und 7µ. Da die IR-Spektren aller Actinomycine



Abbild. 5 IR-Spektrum des "gelben Oxydationsproduktes" des Actinomycins Z_1 (in KBr)

sich sehr ähnlich sind, kann man vermuten, daß große Veränderungen im Molekül nicht eingetreten sind. Dies wurde auch durch qualitative Aminosäurebestimmungen bestätigt; es konnten alle Aminosäuren des Actinomycins Z_1 nachgewiesen werden.

Deutliche Unterschiede gegenüber Actinomycin Z_1 zeigen sich nur im UV-Spektrum. Das Maximum bei 442 mμ ist verschwunden, dafür

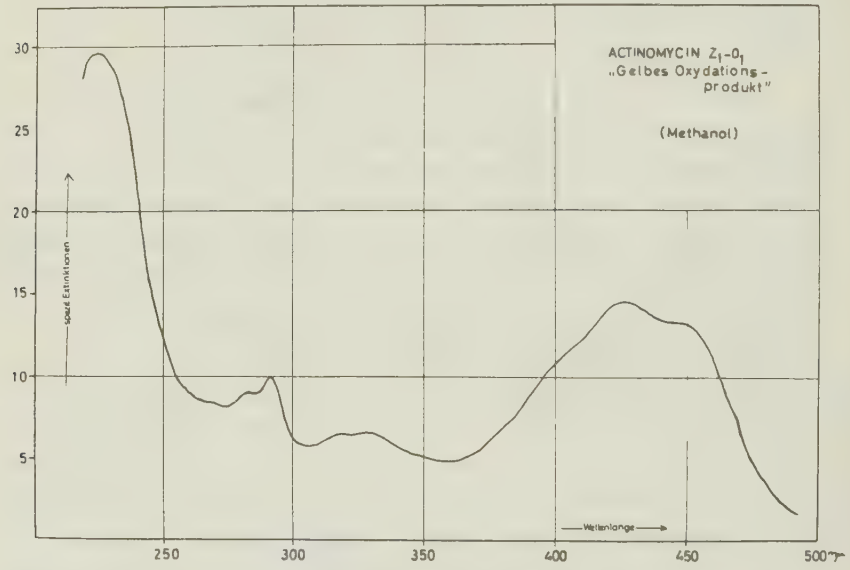


Abbildung 6 UV-Spektrum des "gelben Oxidationsproduktes" (in Methanol)

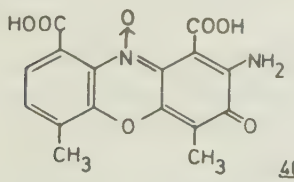
ist ein neues Maximum bei 426 mμ (α = 14.4) mit einer Schulter bei 448 mμ entstanden. Weiterhin treten weniger intensive Maxima bei 292 mμ, 320 mμ und 330 mμ auf. Die kurzwellige Bande des Actinomycinchromophors ist von 240 mμ nach 224 mμ verschoben. Gegenüber Actinomycin Z_1 ist also das Spektrum in den Hauptbanden kurzwellig verschoben.

Einen sehr überraschenden Befund machte ich, als ich eine Probe des Oxydationsproduktes mit Palladium in Methanol hydrierte. Es

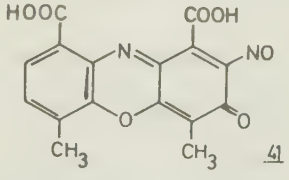
entstand eine farblose Lösung, die sich an der Luft wieder gelb färbte. Das reoxidierte Produkt zeigte im Papierchromatogramm in den Systemen Butylacetat - 10 proz. wäßr. Kresotinat (1:1) und Butylacetat - Dibutyläther - Butanol - 5 proz. wäßr. Kresotinat (6:1:1:8) nicht mehr den R_F-Wert des "gelben Oxydationsproduktes", sondern nur noch den von Actinomycin Z_1. Das bedeutet, daß sich das Oxydationsprodukt durch katalytische Reduktion nach folgendem Schema wieder in Actinomycin Z_1 überführen läßt:

$$\text{Actinomycin } Z_1 \underset{H_2/Pd\ (Methanol)}{\overset{HJO_4}{\rightleftharpoons}} \text{"gelbes Oxydationsprodukt"}$$

Da man annehmen muß, daß die Oxydation nur im Chromophor stattgefunden hat und auch nichts mit der zweiten am Chromophor befindlichen Aminohydroxysäure zu tun haben kann (Actinomycin $X_{0\delta}$ mit zwei Threoninresten am Chromophor wird auch teilweise zu einem analogen leuchtend gelben Produkt umgesetzt), stellt sich die Frage, an welcher Stelle Actinocin (1) oxydiert und mit katalytisch erregtem Wasserstoff zum Ausgangsprodukt reduziert werden kann. Hier bietet sich als beste Deutung die Annahme eines N-Oxids am heterocyclischen Stickstoff (40) oder eine Überführung der am chinoiden Ring des Actinocins befindlichen Aminogruppe ins Nitrosoderivat (41) an. Diese zweite Möglichkeit kann



40



41

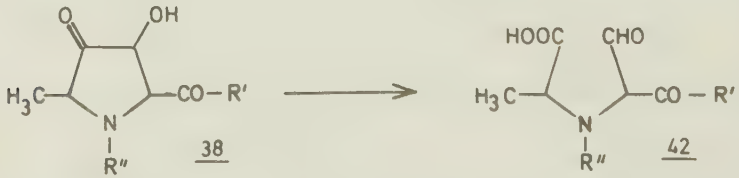
wohl ausgeschlossen werden, da einerseits eine Nitrosogruppe die Banden im UV-Spektrum längerwellig verschieben sollte und da andererseits die Oxydation hier an einer vinylogen Säureamidgruppe einsetzen müßte, was meines Wissens bisher nicht beobachtet wurde. Demnach muß man annehmen, daß das "gelbe Oxydationsprodukt" ein Actinomycin Z_1-N-oxid ist.

Eine Erklärung dafür, daß Actinomycin C_1 und Actinomycin X_2 dieses N-Oxid nicht liefern, ist wohl darin zu suchen, daß sie sich in Äthanol viel schlechter lösen als die Hydroxygruppen tragenden Actinomycine Z_1 und $X_{0\delta}$ und deshalb weniger gut vom Oxidationsmittel angegriffen werden können.

Eine Untersuchung dieses N-Oxids ist auch deshalb wichtig, weil seine antibiotische Wirksamkeit wohl darauf beruht, daß es in der Zelle zum Actinomycin Z_1 reduziert wird. Sollte die Verbindung weniger toxisch sein als Actinomycin Z_1, läßt sich vielleich im Tumortest ein besserer chemotherapeutischer Index erzielen als bei anderen Actinomycinen.

c) Die "sauren Oxydationsprodukte" des Actinomycins Z_1

Einen Beweis für die Struktur der zweiten prolinanalogen Komponente des Actinomycins Z_1 durch Oxydation des in ihm enthaltenen Hydroxy-oxo-systems, z. B. von 38 nach 42, konnte unter den bei der Oxydation erhaltenen neutralen Oxydationsprodukten nicht gefunden werden. Da jedoch auch eine Fraktion entsteht, die saure Stoffe enthält, mußten unter ihnen Actinomycine, die derartige Aufspaltungsprodukte im Molekül enthalten, zu finden sein.

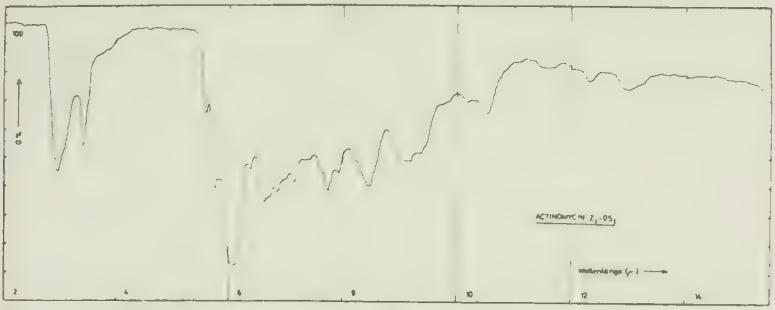


38 42

Aus drei Ansätzen zu je 150 mg Actinomycin Z_1 wurden insgesamt 70 mg saure Produkte isoliert. Die Gesamtmenge wurde an einer Cellulosepulversäule im System Butanol - Butylacetat - 3 proz. wäßr. Kresotinat (7:3:10) chromatographiert. Dabei bildete sich neben zwei auf der Säule braun gefärbten Zonen mit kleinen R_F-Werten eine actinomycingelbe Zone aus. Ihr Inhaltsstoff wurde eluiert, nach Adsorption an saurem Kieselgel durch Nachwaschen

mit Chloroform von Kresotinsäure befreit, mit Methanol eluiert und aus Chloroform/Petroläther umgefällt.

Das erhaltene rote Pulver (30 mg) zeigt im IR-Spektrum (Abbild. 7) neben der intensiven Lactoncarbonylbande bei 5.74μ (1740 cm^{-1}) eine Schulter bei 5.80μ (1721 cm^{-1}) und eine Bande bei 5.60μ (1785 cm^{-1}). In der Lage und Intensität der anderen Banden ähnelt



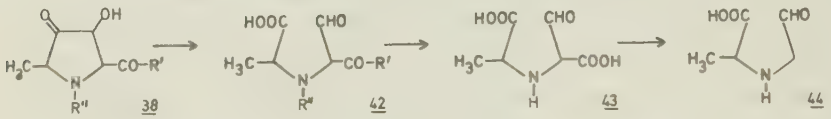
Abbild. 7 IR-Spektrum des "sauren Oxydationsproduktes" (KBr)

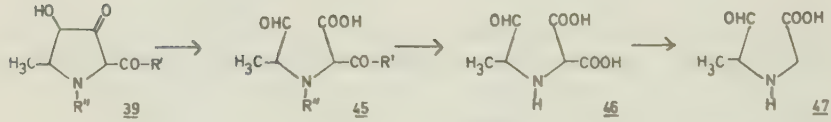
das Spektrum mehr dem Actinomycin Z_1 als der Actinomycin Z_1-Säure. Der Schmelzpunkt liegt mit 235° niedriger als der von Actinomycin Z_1 (250°), aber deutlich höher als der von Actinomycinsäuren, in denen die Lactongruppen verseift sind (190°). Man kann daraus schließen, daß beide Lactonringe unversehrt sind und die saure Gruppe an einer anderen Stelle des Moleküls entstanden ist.

Das UV-Spektrum ist identisch mit dem von Actinomycin Z_1 und der R_F-Wert im System Butanol - Butylacetat - 3 proz. wäßr. Kresotinat (7:3:10) ist deutlich größer als der der Actinomycinsäure Z_1-S_1, in der beide Lactonringe des Actinomycins Z_1 hydrolytisch geöffnet sind. Antibiotisch ist die Substanz unwirksam.

Im Totalhydrolysat (6n HCl, 48 Stdn. bei 110°) konnten pherographisch und chromatographisch neben allen bisher bekannten Aminosäuren des Actinomycins Z_1 deutlich Alanin, Glycin und schwach Serin nachgewiesen werden. Daneben trat im Papierchromatogramm noch eine Zone mit sehr kleinem R_F-Wert auf.

Wenn man einmal annimmt, daß nach der Totalhydrolyse aus dem oxidierten Hydroxy-oxo-methylprolinbaustein des Actinomycins Z_1 die freie Aminosäure 43 bzw. 46 entsteht, so dürfte diese unter den sauren Hydrolysebedingungen leicht decarboxylieren unter Bildung der Endprodukte 44 und 47. Aus 44 sollte bei der





Hydrolyse zum Teil Alanin, aus 47 zum Teil Glycin gebildet werden. Da beide Produkte im Pherogramm und Chromatogramm identifiziert werden konnten, bildet dies einen weiteren Beweis dafür, daß im Actinomycin Z_1 entweder ein Mol 3-Hydroxy-4-oxo-5-methylprolin 38 oder ein Mol 3-Oxo-4-hydroxy-5-methylprolin 39 enthalten ist.

Um auszuschließen, daß auch der 4-Oxo-5-methylprolinrest im Actinomycin Z_1 oxydiert wird, etwa über die Enolstruktur 48 zur Verbindung 49, wurde das saure Oxydationsprodukt nach Meerwein-

Ponndorf mit Aluminiumisopropylat reduziert. Ist der 4-Oxo-5-methylprolinrest nicht angegriffen, muß man im Totalhydrolysat 4-Hydroxy-5-methylprolin nachweisen können. Der Versuch wurde durchgeführt, und ich konnte im Hochspannungspherogramm 4-Hydroxy-5-methylprolin in cis- und trans-Form nachweisen.

Die zweite Prolinkomponente des Actinomycins Z_1 ist also entweder ein 3-Hydroxy-4-oxo-5-methylprolin 38 oder ein 3-Oxo-4-hydroxy-5-methylprolin 39. Die Stellung der Hydroxy- und der Oxogruppe ist nicht sicher anzugeben. Aus der Acetylierung zum Actinomycin Z_1-diacetat könnte man jedoch folgern, daß die Oxogruppe in 3-Stellung steht (39) und nach 50 enolisiert wird.

Andererseits wäre es auch möglich, daß eine Enolisierung der in 4-Stellung stehenden Oxogruppe (38) nach 51 durch Acetylierung mit Acetanhydrid/Pyridin begünstigt wird.

Vorerst nicht zu klären ist auch die Konfiguration dieser Aminosäure.

Aus dem noch unbekannten Teil des Actinomycins Z_1 mit der Summenformel

$$C_{9-11}\ H_{15-19}\ N_2\ O_5 \qquad (21)$$

läßt sich damit das Teilstück $C_6H_7NO_3$ eliminieren und es bleibt noch ein unbekannter Rest der Summenformel

$$C_{3-5}\ H_{8-12}\ N\ O_2 \qquad (52)$$

übrig.

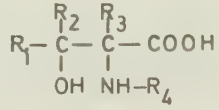
4. Die Actinomycin Z_1-Säuren

Nach dem Bauplan der Actinomycine (s. Abbild. 1) fehlt im Actinomycin Z_1 noch eine Aminohydroxysäure, die für die Lactonbindung mit N-Methylvalin oder N-Methylalanin verantwortlich ist. Sie besitzt, da alle anderen neun Aminosäurereste des Actinomycins Z_1 jetzt bekannt sind, die Summenformel

$$C_{3-5}\ H_{8-12}\ N\ O_2. \qquad (52)$$

Diese Aminohydroxysäure muß unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse, auch nach vorheriger Reduktion des Actinomycins zur Leukoverbindung, völlig zerstört werden und auch unter den Bedingungen der reduzierenden Hydrolyse mit Jodwasserstoffsäure und rotem Phosphor zu nicht identifizierbaren Produkten zersetzt werden.

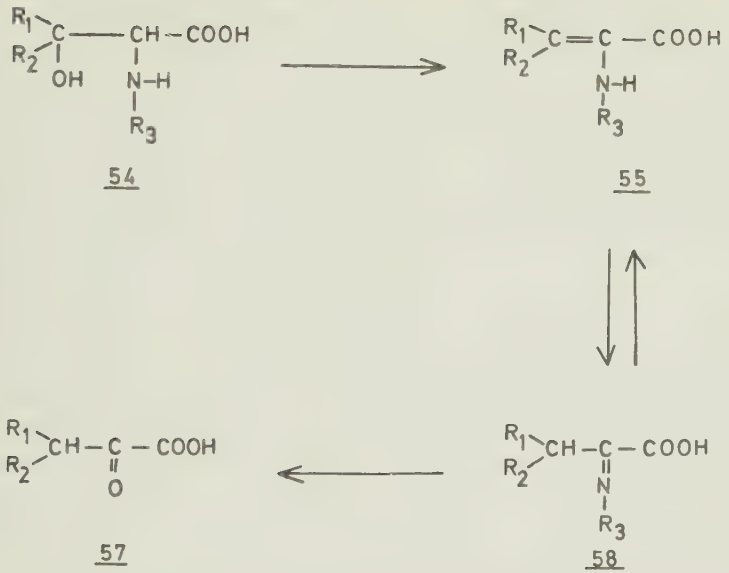
Nimmt man an, daß es sich bei diesem fehlenden Actinomycinbaustein um eine α-Amino-ß-hydroxysäure 53 handelt, so erhält man



53

mit der Summenformel 52 die in Tabelle 1 angegebenen Möglichkeiten.

Keine der in dieser Tabelle aufgeführten Aminosäuren ist in freiem Zustand besonders säurelabil. Außer der in geringem Maße einsetzenden sauren Dehydratisierung nach 54 - 57, die zur Bildung von α-Oxocarbonsäuren[26,27] führt (wahrnehmbar am sehr intensiven bouillonartigen Geruch), wurde keine andere Umwandlung beobachtet. Selbst beim ß-Hydroxyvalin (Tab. 1, Nr. 6), das infolge seiner tertiären Hydroxygruppe sehr leicht dehydratisiert werden müßte, wurde in einem quantitativen Testversuch (48 stdge. Behandlung mit 6n HCl bei 110°) keine nennenswerte Zerstörung festgestellt.



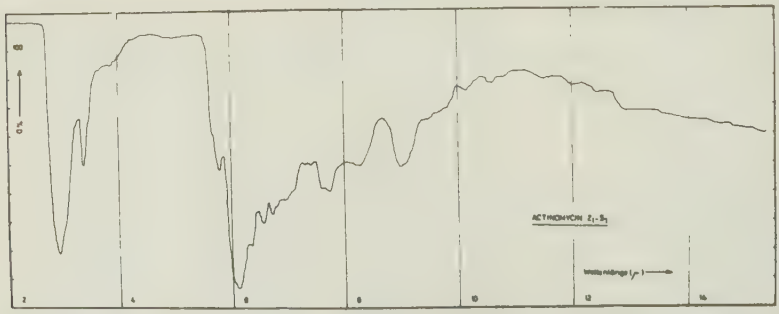
54 55 57 58

Tabelle 1 : Mögliche Strukturen des zweiten threoninanalogen Bausteins des Actinomycins Z_1

	Aminosäure	Substitution	Summenformel
1.	Serin	$R_1=R_2=R_3=R_4 = H$	$C_3H_4NO_2$
2.	N-Methylserin	$R_1=R_2=R_3 = H$; $R_4 = CH_3$	$C_4H_6NO_2$
3.	Threonin	$R_1 = CH_3$; $R_2=R_3=R_4 = H$	$C_4H_6NO_2$
4.	α-Methylserin	$R_1=R_2=R_4 = H$; $R_3 = CH_3$	$C_4H_6NO_2$
5.	ß-Hydroxy-norvalin	$R_1 = C_2H_5$; $R_2=R_3=R_4 = H$	$C_5H_8NO_2$
6.	ß-Hydroxy-valin	$R_1=R_2 = CH_3$; $R_3=R_4 = H$	$C_5H_8NO_2$
7.	α-Methylthreonin	$R_1=R_3 = CH_3$; $R_2=R_4 = H$	$C_5H_8NO_2$
8.	N-Methylthreonin	$R_1=R_4 = CH_3$; $R_2=R_3 = H$	$C_5H_8NO_2$
9.	α-Methyl-N-methyl-serin	$R_1=R_2 = H$; $R_3=R_4 = CH_3$	$C_5H_8NO_2$

Die Säurelabilität der in Actinomycin Z_1 vorhandenen Aminohydroxysäure kann demnach erst durch die Bindung im Peptidverband des Actinomycins Z_1 zustande kommen. Um festzustellen, ob die beiden Säureamidbindungen oder die Lactonbindung für diese Zersetzung verantwortlich sind, wurde nach einer Vorschrift von H. Brockmann und J. H. Manegold[28] eine Lactonspaltung mit 5n Natriummethylat durchgeführt. Die erhaltene Actinomycinsäure (im folgenden Actinomycinsäure Z_1-S_1 genannt) besitzt nach den Elementaranalysen mit Sicherheit zwei Sauerstoffatome mehr als Actinomycin Z_1, ein Beweis dafür, daß bei der Lactonspaltung keine Eliminierung von Sauerstoff eingetreten ist. Dies war an sich bei Actinomycinsäuren, die zwei Threoninreste im Molekül enthalten, schon bekannt, mußte aber für die neue, empfindlichere Aminohydroxysäure des Actinomycins Z_1 erst bestätigt werden.

Die Actinomycinsäure Z_1-S_1, die in genügender Reinheit entstanden war (α_{443} = 17.75; in Methanol), zeigt das gleiche IR-Spektrum (Abbild. 8) wie alle anderen Actinomycinsäuren. Die in Actinomycinen vorhandene Lactoncarbonylbande bei 5.74μ (1740 cm^{-1}) ist verschwunden, dafür ist eine neue Bande bei 5.80μ (1721 cm^{-1}) entstanden, die einer Carboxygruppe zuzuordnen ist.



Abbild. 8 IR-Spektrum der Actinomycinsäure Z_1-S_1 (in KBr)

Aus diesen Ergebnissen geht eindeutig hervor, daß in der Actinomycinsäure Z_1-S_1

1. beide Lactonringe geöffnet sind und
2. keine Eliminierung von Sauerstoff eingetreten ist.

Qualitative und quantitative Aminosäureanalysen sollten nun zeigen, ob die Labilität der zweiten threoninanalogen Komponente durch geöffnete Lactonbindungen geringer geworden ist. Die Bestimmungen ergaben, daß außer den im Actinomycin Z_1 bereits gefundenen sieben Aminosäuren keine neue Aminosäure auch nur in Spuren nachweisbar ist.

Damit ist eindeutig gezeigt, daß die Labilität des im Actinomycin Z_1 vorhandenen threoninanalogen Bausteins nicht durch die Lactonbindung verursacht wird.

Diese Befunde decken sich völlig mit den bei anderen Actinomycinen erhaltenen Ergebnissen. Denn auch Threonin wird im Peptidverband des Actinomycins bei Hydrolyse unter reduzierenden Bedingungen zu 30 % zerstört und auch hier findet man eine gleichgroße Zersetzung bei den entsprechenden Actinomycinsäuren.

Um auch noch den Einfluß der Peptidbindung zwischen Aminohydroxysäure und der nächst folgenden Aminosäure bei der unter sauren Bedingungen erfolgenden Zersetzung der chromophorgebundenen Aminohydroxysäure abschätzen zu können, wurden quantitative Aminosäurebestimmungen von Actinocinyl-bis-threonin herangezogen (s. Dissertation J. H. Manegold; Aminosäurebestimmungen Nr. 4, 5, 6, 21, 38 und 55). Diese zeigen eindeutig, daß auch bei Actinocinylpeptiden, in denen unsubstituiertes Threonin an Actinocin gebunden ist, eine 30 proz. Zerstörung des Threonins bei der sauren Hydrolyse eintritt.

Das bedeutet, daß für die Säurelabilität des am Chromophor gebundenen Aminohydroxysäurebausteins nur die Bindung zum Chromophor verantwortlich ist. Die Hydrolyse dieser Bindung muß mit einer 30 proz. Zerstörung des Threonins und einer vollständigen Zerstörung der zweiten threoninanalogen Komponente des Actinomycins Z_1 verbunden sein.

Es schien daher zweckmäßig, festzustellen, warum Threonin, an Actinocin gebunden, derart unbeständig ist. Kann man diese Frage klären, so können durch analoge Betrachtungen Rückschlüsse auf den noch unbekannten Baustein des Actinomycins Z_1 gezogen werden.

Wenn man das saure Totalhydrolysat eines Actinomycins untersucht, fällt zunächst der starke Geruch nach α-Oxobuttersäure auf. Diese Säure ist papierchromatographisch als 2.4-Dinitrophenylhydrazon[20] nachweisbar. Es hat also den Anschein, daß die saure Dehydratisierung der in Actinomycinen vorhandenen Threoninreste nach 54 - 57 gegenüber der sauren Dehydratisierung bei den freien Aminosäuren erleichtert ist.

Um festzustellen, ob nach saurer Totalhydrolyse im Actinomycin Z_1 neben α-Oxobuttersäure noch eine andere Oxocarbonsäure nachzuweisen ist, habe ich 100 mg Actinomycin Z_1 unter den von G. Döring [20] angegebenen Bedingungen sauer hydrolysiert, den salzsauren Eindampfrückstand mit Äther extrahiert, den Ätherextrakt chromatographiert und im Chromatogramm nach einem von Th. Wieland und E. Fischer angegebenen Verfahren durch Entwickeln mit o-Phenylendiamin auf Oxocarbonsäuren geprüft. Dabei konnte ich schwach α-Oxobuttersäure nachweisen. Eine andere Oxocarbonsäure wurde nicht gefunden.

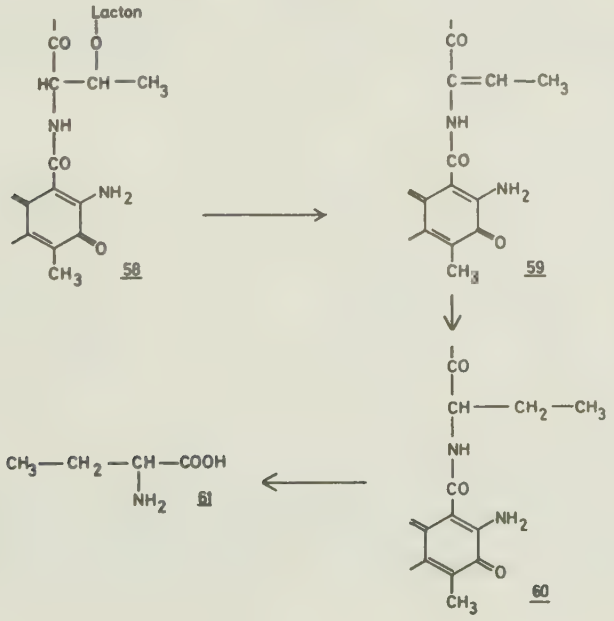
Diese Ergebnisse kann man nach zwei Gesichtspunkten interpretieren:

1. Auch die zweite Aminohydroxysäure des Actinomycins Z_1 ist in α-Oxobuttersäure übergegangen. Trifft das zu, dann bleibt von den in Tabelle 1 angegebenen neun Aminosäuren außer Threonin nur N-Methylthreonin über, das bei saurer Dehydratisierung ebenfalls teilweise α-Oxobuttersäure liefern müßte.
2. Die zweite Aminohydroxysäure des Actinomycins Z_1 ist nicht oder nur in nicht nachweisbarer Menge in eine α-Oxocarbonsäure überführt worden. Dies könnte einmal der Fall sein, wenn, wie bei den α-Methyl-aminohydroxysäuren 4, 7 und 9 der Tabelle 1 die Entstehung von α-Oxocarbonsäuren nicht möglich ist. Andererseits kann die Bildung von α-Oxocarbonsäuren aber auch auf Kosten einer anderen, nicht bekannten Umwandlung zurückgedrängt sein.

Da ich durch saure Hydrolyse weder ninhydrinpositive Substanzen noch Oxocarbonsäuren fand, die Hinweise auf die Struktur der

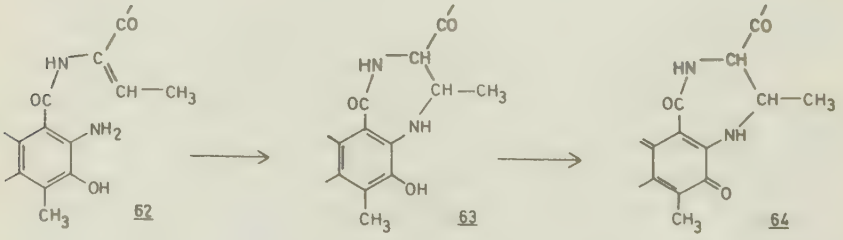
außer Threonin im Actinomycin Z_1 vorhandenen Aminohydroxysäure gaben, habe ich zunächst versucht, diese Aminohydroxysäure im Peptidverband des Actinomycins Z_1 in ein beständiges Derivat zu überführen.

Bei der Umsetzung von Actinomycin C_1 mit 0.1 normaler, methanolischer Natronlauge erhielten H. Brockmann und B. Franck[29] eine Actinomycinsäure (Actinomycinsäure F), in der nur noch ein Mol Threonin nachzuweisen ist. Da während der Reaktion keine Abspaltung von Threonin erfolgt war, muß das zweite Mol in veränderter Form in der Actinomycinsäure F vorliegen. A. Boiteux[30] klärte diese Frage, als es ihm gelang, durch Hydrierung der Actinomycinsäure F und anschließende Hydrolyse α-Aminobuttersäure nachzuweisen. Demnach muß also aus dem umgewandelten Threoninrest durch Hydrierung α-Aminobuttersäure entstehen. Das bedeutet, daß bei der Lactonspaltung mit verdünntem Alkali eine Eliminierung zur α-Aminocrotonsäure 59 einsetzt, die dann nach Hydrierung und Hydrolyse über 60 in 61 übergeht.



Da die Ausbeuten an Actinomycinsäure F nicht besonders gut waren (30 %), was wohl hauptsächlich auf den gegen Alkali unbeständigen Chromophor zurückzuführen ist, verbesserte A. Boiteux[30] die Methode dadurch, daß er 0.1 n NaOH in Isopropanol/Wasser auf das Leukoactinomycin einwirken ließ. Er erhielt dabei Ausbeuten, die um 95 % lagen. In dieser Actinomycinsäure (B III) wurden nur 0.29 Mol Threonin gefunden und nach Hydrierung zusätzlich 0.5 Mol α-Aminobuttersäure. Es läßt sich also insgesamt nur ein Mol Threonin nachweisen; das zweite Mol ist so weit umgewandelt, daß es auch nach Hydrierung mit Platinoxid in Eisessig nicht mehr als α-Aminobuttersäure zu identifizieren ist. Im UV-Spektrum dieser Actinomycinsäure BIII ist das langwellige Maximum bei 442 mμ um 17 mμ nach 459 mμ verschoben, und die kurzwellige Bande bei 240 mμ ist nur noch als Schulter nachzuweisen.

G. Döring[20] deutete diese Befunde, indem er annahm, daß beim Einwirken von Alkali auf das Leukoactinomycin zunächst eine Eliminierung zu 62 eintritt. Dann addiert sich die Aminogruppe des Chromophors an die Doppelbindung unter Ausbildung eines Siebenrings (63), der nach Reoxidation des Chromophors erhalten bleibt (64).

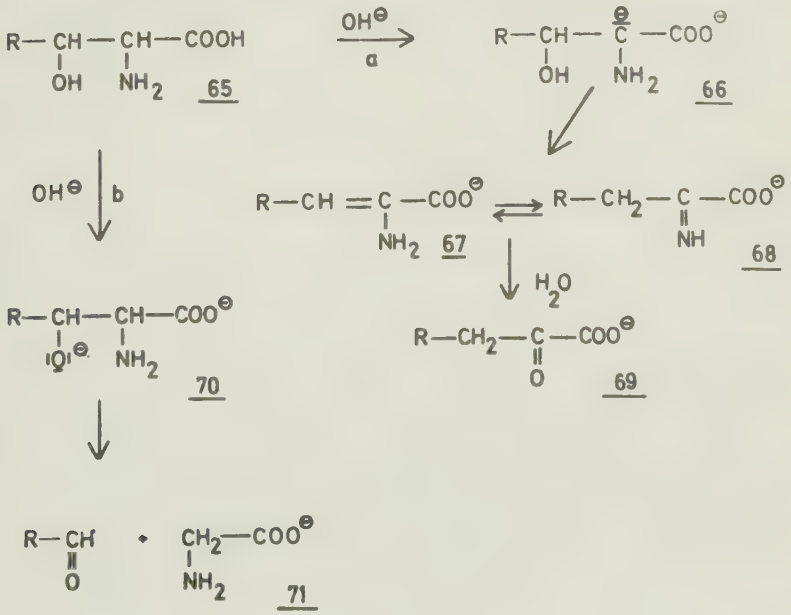


Das am benzoiden Teil des Actinocins gebundene Threonin sollte dann in Übereinstimmung mit den Aminosäurebestimmungen zur Hälfte unverändert und zur Hälfte in den Aminocrotonsäurerest übergegangen sein. Die Bildung des Siebenrings könnte die

Verschiebung im UV-Spektrum sowie den von W. Sunderkötter[19] und G. Döring[20] durchgeführten einseitigen Abbau der benzoiden Peptidkette des Actinomycins C_2 erklären.

A. Boiteux[30] erhielt noch eine weitere Actinomycinsäure, als er Actinomycin C_3 in 0.1 normaler, isopropan.-wäßr. Natronlauge bei Gegenwart von Raney-Nickel vier Tage unter Wasserstoff hydrierte. Die erhaltene Actinomycinsäure (B V) zeigte ebenfalls die langwellige Verschiebung im UV-Spektrum; Threonin war nicht mehr nachzuweisen.

Alle diese oben angeführten Umwandlungen des Threonins im Peptidverband des Actinomycins werden auch bei den freien Aminohydroxysäuren, allerdings nur unter sehr energischen Reaktionsbedingungen, beobachtet. So hatten Th. Wieland und Mitarbeiter[31] gezeigt, daß Aminohydroxysäuren bei mehrstündigem Erhitzen mit wäßr. Bariumhydroxid zwei Spaltungsreaktionen eingehen: Neben



der Eliminierung von Wasser, die über die α-Amino-α,ß-ungesättigten Carbonsäuren 67 zu den α-Oxocarbonsäuren 68 führt (Reaktionsweg a), tritt eine Aldolspaltung zwischen C_α und C_β (Reaktionsweg b) zu 71 ein.

Reaktionsweg a tritt vorwiegend bei den wenig substituierten Aminosäuren Serin und Threonin auf, während bei höherer Alkylsubstitution an C_β (z. B. ß-Hydroxy-valin) und auch bei Alkylierung am Stickstoff vorwiegend Retroaldolreaktion einsetzt.

Um die Struktur der zweiten threoninanalogen Komponente des Actinomycins Z_1 zu ermitteln, erschien es mir am zweckmäßigsten, die Bedingungen, die A. Boiteux bei der Darstellung der Actinomycinsäure B V erprobt hatte, anzuwenden. Unter milden alkalischen Bedingungen sollte bei Gegenwart von Raney-Nickel unter Wasserstoff eine Eliminierung der Hydroxygruppen des Threonins und der unbekannten Aminohydroxysäure mit anschließender Hydrierung zu α-Aminobuttersäure und der entsprechenden gesättigten, unbekannten Aminosäure im Peptidverband des Actinomycins Z_1 erfolgen. Im Hydrolysat der erhaltenen Actinomycinsäure hoffte ich dann die unbekannte, sauerstoffreie Aminosäure zu finden, um von hier aus Rückschlüsse auf den im Actinomycin Z_1 vorhandenen Aminohydroxysäurerest ziehen zu können.

Hydriert man eine Lösung von Actinomycin Z_1 mit Raney-Nickel in Isopropanol/Wasser (1:1), gibt anschließend unter Wasserstoff soviel n NaOH zu, daß die Lösung etwa 0.1 normal wird und hält das Reaktionsgemisch vier Tage unter hydrierenden Bedingungen auf 40°, so erhält man nach Ansäuern der Lösung und Reoxidation des Chromophors an der Luft ein Reaktionsprodukt, in dem papierchromatographisch vier Hauptzonen und drei schwache Nebenzonen zu erkennen sind. Die Gesamtmenge wird an einer Cellulosepulversäule im System Butanol - Butylacetat - 3 proz. Kresotinatlösung (7:3:10) in vier Zonen aufgetrennt (Z_1-S_4, Z_1-S_5, Z_1-S_6 und Z_1-S_7; nach steigendem R_F-Wert durch arabische Ziffern gekennzeichnet). Geringe Mengen von Nebenprodukten sind dabei eluiert worden (Z_1-S_{8-10}).

Die vier erhaltenen Actinomycinsäuren befreit man durch Adsorption an Kieselgel und Nachwaschen mit Chloroform von Kresotinsäure und fällt nach Eluieren mit Methanol aus Chloroform/Petroläther um. Papierchromatogramme zeigen, daß die Actinomycinsäuren Z_1-S_4, Z_1-S_5 und Z_1-S_6 chromatographisch einheitlich sind, während in der Actinomycinsäure Z_1-S_7 geringe Mengen von Vorzonen mit größeren R_F-Werten und Spuren der Actinomycinsäure Z_1-S_6 enthalten sind.

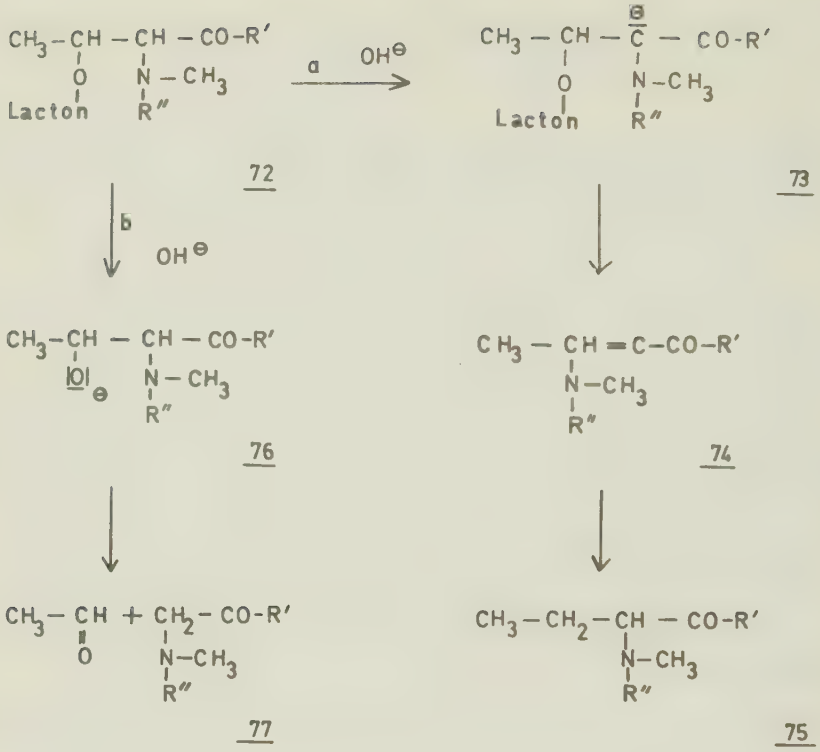
Alle vier Actinomycinsäuren zeigen fast das gleiche IR-Spektrum; lediglich in der Intensität der Banden ergeben sich geringe Unterschiede. Einen überraschenden Befund zeigte jedoch das UV-Spektrum. Im Gegensatz zu den von A. Boiteux unter gleichen Bedingungen erhaltenen Actinomycinsäuren des Actinomycins C_3 beobachtete ich keine Verschiebung der Banden; das langwellige Maximum liegt wie beim Actinomycin Z_1 bei 442 mμ.

Die qualitative Aminosäurebestimmung zeigt, daß außer α-Aminobuttersäure keine neue Aminosäure nachzuweisen ist. In quantitativen Bestimmungen fand ich jedoch in der Actinomycinsäure Z_1-S_5 2.4 Mol Sarkosin und in der Actinomycinsäure Z_1-S_6 2.6 Mol Sarkosin.

In den Totalhydrolysaten der Inhaltsstoffe der Vorzonen (Actinomycinsäuren Z_1-S_{8-10}) sowie in der Actinomycinsäure Z_1-S_7 konnte pherographisch und papierchromatographisch N-Methylaminobuttersäure sicher nachgewiesen werden.

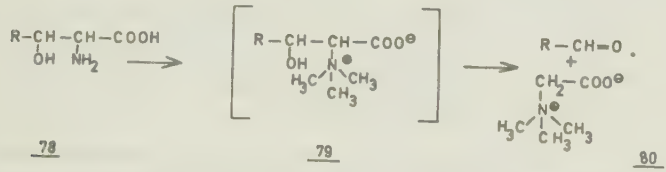
Im Actinomycin Z_1 muß also eine Aminosäure enthalten sein, die bei Lactonspaltung unter hydrierenden Bedingungen zum großen Teil in Sarkosin und zum kleineren Teil in N-Methylaminobuttersäure übergegangen ist. Dieser Aminosäurebaustein kann nur N-Methylthreonin (72) sein, das nach dem von Th. Wieland angegebenen Schema vorwiegend Retroaldolreaktion zum Sarkosin (77) eingeht und nur in geringem Maße in N-Methylaminobuttersäure (75) umgewandelt wird.

Daß N-Methylthreonin auch in freiem Zustand vorwiegend Retroaldolreaktion eingeht, konnte ich durch einen Versuch zeigen.



10 mg N-Methylthreonin wurden 12 Stdn. mit heiß gesättigtem Bariumhydroxid auf 110° erhitzt, mit n H_2SO_4 neutralisiert, vom ausgefallenen Bariumsulfat abzentrifugiert und i. Vak. zur Trockne eingedampft. Im Rückstand, in 1 ccm Wasser aufgenommen, war chromatographisch und pherographisch neben unverändertem Ausgangsprodukt und einem nicht identifizierten Produkt ein neuer ninhydrinpositiver Fleck mit dem R_F-Wert des Sarkosins nachzuweisen. N-Methylaminobuttersäure war auch nicht in Spuren entstanden.

Daß die Bindung zwischen α- und ß-ständigem Kohlenstoff in am Stickstoff alkylsubstituierten Aminohydroxysäuren besonders labil ist, zeigten auch schon H. E. Carter und D. B. Melville[32], als sie versuchten, die Betaine von Serin und Threonin (78) durch Behandeln von Serin und Threonin mit Dimethylsulfat und Natronlauge darzustellen (79). Sie erhielten unter Retroaldolspaltung ausschließlich die Glycinbetaine (80).



78 79 80

Mit dem Nachweis von einem Mol N-Methylthreonin im Actinomycin-Z_1 konnten folgende bis dahin nicht deutbaren Ergebnisse bei der Untersuchung des Actinomycins Z_1 erklärt werden:

1. Im Actinomycin Z_1 wurden 5.5 % (N)-Methyl gefunden. Bei einem Molekulargewicht von 1300 entspricht das 4.77 N-Methylgruppen. Es muß also außer den vier nachgewiesenen N-Methylgruppen (zwei im Sarkosin und je eine im N-Methylvalin und N-Methylalanin) eine fünfte N-Methylgruppe im Actinomycin Z_1 vorhanden sein, die sich, da alle anderen Aminosäurereste bekannt sind, nur in der Aminohydroxysäure befinden kann.
2. Die Integration der NMR-Spektren des Actinomycins Z_1 und seiner Derivate deutet im Bereich der N-Methylprotonen (δ = 2.9 ppm) ebenfalls auf 15 Protonen (5 N-Methylgruppen) hin.
3. Wie oben angedeutet, tritt bei den von A. Boiteux dargestellten Actinomycinsäuren im UV-Spektrum eine Verschiebung gegenüber den eingesetzten Actinomycinen auf, die auf die Bildung eines Siebenrings zurückzuführen sein soll (64). In den Actinomycinsäuren Z_1-S_5, Z_1-S_6 und Z_1-S_7 tritt diese Verschiebung nicht auf. Eine Erklärung dafür wäre, daß in diesen Actinomycinsäuren N-Methylthreonin in Sarkosin umgewandelt ist, bei dem sich der Siebenring nicht mehr ausbilden kann.

   Dies setzt allerdings voraus, daß der N-Methylthreoninrest

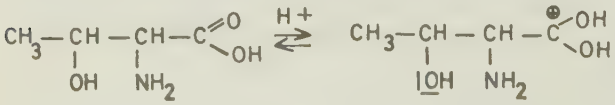
des Actinomycins Z_1 sich am chinoiden Teil des Actinocins befindet. Sollte sich der Threoninrest an dieser Stelle befinden, so müßte sich, wenn die Siebenring-Theorie von G. Döring richtig ist, eine langwellige Verschiebung der Banden im UV-Spektrum nachweisen lassen.

4. Bei saurer Hydrolyse von Actinomycin Z_1 läßt sich im Hydrolysat als einzige Oxocarbonsäure α-Oxobuttersäure nachweisen. Da bei saurer Dehydratisierung von N-Methylthreonin nach 54 - 57 ebenfalls nur α-Oxobuttersäure gebildet werden kann, ist das ein weiterer Beweis für das Vorliegen von N-Methylthreonin im Peptidverband des Actinomycins Z_1.

Nicht geklärt ist, warum N-Methylthreonin im Peptidverband des Actinomycins Z_1 bei saurer Hydrolyse vollständig zerstört wird. Da auch eine 30 proz. Zersetzung des Threonins unter diesen Bedingungen beobachtet wird und da N-Methylaminosäuren bekanntlich empfindlicher sind als nicht am Stickstoff alkylierte Aminosäuren, ist eine größere Zerstörung des N-Methylthreonins jedoch durchaus verständlich.

Wie kann man nun die völlige Zerstörung des N-Methylthreonins im Peptidverband des Actinomycins Z_1 erklären? Wie schon oben angedeutet, setzt bei der sauren Totalhydrolyse von Actinomycinen stets eine Dehydratisierung zu α-Oxocarbonsäuren ein. Diese Reaktion kann jedoch nur in untergeordnetem Maße ablaufen, da die nachgewiesenen α-Oxobuttersäuremengen in Actinomycin Z_1-Totalhydrolysaten sehr gering sind.

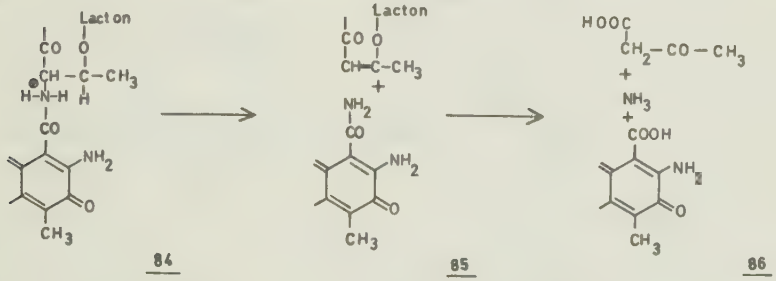
Weiterhin könnte bei der sauren Hydrolyse von Actinomycin Z_1 auch eine der sauren Aldolreaktion analoge Retroaldolreaktion einsetzen[31]. Tatsächlich findet man in allen threoninhaltigen Actinomycinhydrolysaten stets geringe Mengen Glycin, die nach 81 - 83 aus Threonin entstehen können.



81 82 83

Eine Methylierung am Stickstoff sollte nach Ergebnissen von H. E. Carter und D. B. Melville[32] die Bindung zwischen C_α und C_β noch mehr labilisieren und zur Bildung von Sarkosin führen. Da jedoch im Actinomycin Z_1 schon zwei Mol Sarkosin vorhanden sind und auch nur Werte um zwei Mol gefunden werden, darf diese Reaktion auch nicht in größerem Umfange ablaufen.

Die letzte Möglichkeit wäre die, daß infolge der großen Gruppenhäufung um die zwischen Actinocin und Threonin (bzw. N-Methylthreonin) vorhandene Carbonamidgruppe der Angriff eines Wassermoleküls erschwert ist und damit die Hydrolyse dieser Carbonamidgruppe durch Spaltung der Bindung zwischen Stickstoff und dem α-Kohlenstoffatom des Threonins einsetzt (84). Die entstehende Verbindung könnte sich durch Abspaltung eines Protons vom ß-Kohlenstoffatom stabilisieren (85). Der Threoninrest würde wie der N-Methylthreoninrest in Acetessigsäure (86) bzw. Aceton und Kohlendioxid übergehen. Beim N-Methylthreonin sollte infolge noch größerer Gruppenhäufung um die zu spaltende Carbonamidgruppe dieser Mechanismus noch weiter bevorzugt sein.



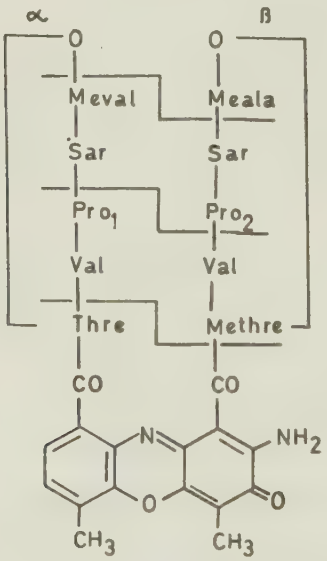
84 85 86

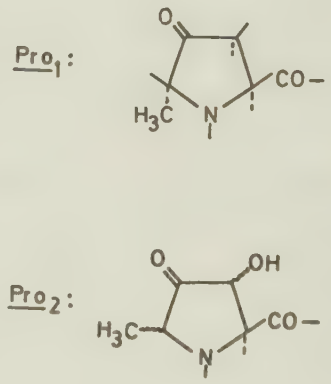
Eine endgültige Aussage, warum Threonin im Peptidverband des Actinomycins Z_1 zu 30 % und N-Methylthreonin vollständig zerstört wird, läßt sich jedoch nicht geben.

Im Actinomycin Z_1 ist als zehnter Aminosäurebaustein N-Methylthreonin, eine meines Wissens bisher in der Natur nicht gefundene Aminosäure, enthalten. Sie kann indirekt nach Umwandlung

in Sarkosin und N-Methylaminobuttersäure eindeutig nachgewiesen werden. Ein direkter Nachweis dieser Aminosäure ist bisher nicht gelungen.

Damit sind alle zehn Aminosäurebausteine des Actinomycins Z_1 bekannt. Vier von diesen Bausteinen, nämlich N-Methylalanin, 4-Oxo-5-methylprolin, 3-Hydroxy-4-oxo-5-methylprolin (bzw. 3-Oxo-4-hydroxy-5-methylprolin) und N-Methylthreonin, sind bis jetzt in anderen Verbindungen in der Natur nicht gefunden worden. Außer N-Methylalanin erwiesen sich die anderen drei neuen Aminosäuren bei der Hydrolyse als so unbeständig, daß sie nur indirekt nachgewiesen werden konnten.





87

Actinomycin Z_1 besitzt, wenn man den Bauplan der Actinomycine (Abbild. 1) zugrunde legt, die Strukturformel 87. Da die Aminosäuresequenz des Actinomycins Z_1 nur in Analogie zum Bauplan der Actinomycine aufgestellt wurde, habe ich als nächstes versucht, diese Sequenz zu bestätigen.

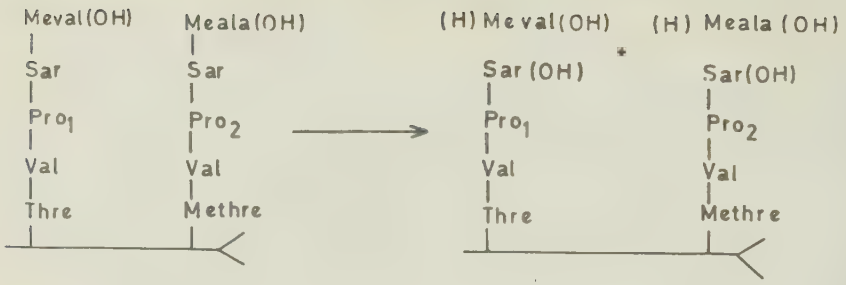
5. Beitrag zur Sequenzanalyse des Actinomycins Z_1

Nachdem der Chromophor und die zehn Aminosäurebausteine des Actinomycins Z_1 bekannt waren und eine den übrigen Actinomycinen analoge Strukturformel (87) aufgestellt werden konnte, mußten Beweise für die angenommene Sequenz gefunden werden. War es gelungen, die Stellung einiger der zehn Aminosäurebausteine zu beweisen und stimmte diese mit der vorgeschlagenen Struktur 87 überein, so konnte man den allgemeinen Bauplan der Actinomycine mit einiger Sicherheit auch auf Actinomycin Z_1 übertragen.

Da Actinomycin Z_1 antibiotisch wirksam ist, müssen seine zehn Aminosäurebausteine auf zwei Peptidlactonringe mit je fünf Aminosäuren verteilt sein; denn man hat bisher kein antibiotisch wirksames Actinomycinderivat gefunden, das im Peptidteil nicht zwei Lactonringe mit je fünf Aminosäuren enthält. Auch bei Erweiterung der Lactonringe auf sechs Aminosäuren war die antibiotische Wirksamkeit nicht mehr vorhanden.

Bekannt war, daß die Säureamidbindungen zwischen zwei N-Methylaminosäuren gegenüber konz. Salzsäure besonders empfindlich sind. So hatten H. Brockmann und Mitarbeiter[33)] gezeigt, daß beim Einwirken von konz. Salzsäure auf Actinomycin C_3 vorzugsweise die Bindungen zwischen Sarkosin und N-Methylvalin unter Bildung der Seco-actinomycine geöffnet werden. In ihnen ist N-Methylvalin nur noch über eine Lactonbindung mit Threonin verbunden.

Überträgt man diese Ergebnisse auf die Actinomycinsäure Z_1-S_1 (88), so sollte es möglich sein, die Bindung zwischen Sarkosin und N-Methylvalin bzw. zwischen Sarkosin und N-Methylalanin zu spalten und die N-Methylaminosäuren nachzuweisen. Ist Sarkosin nicht mit einer dieser beiden N-Methylaminosäuren verbunden, dürfte auch keine Spaltung einsetzen. Befindet sich dagegen die Bindung zwischen Sarkosin und den beiden N-Methylaminosäuren nicht am Ende der Peptidkette, so müßten N-Methylvalin oder N-Methylalanin enthaltende Peptide abgespalten werden.

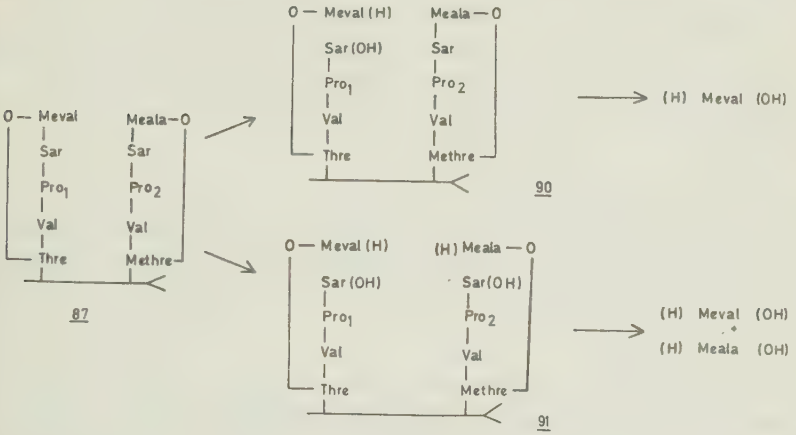


88 89

Behandelt man Actinomycinsäure Z_1-S_1 (88) 25 Min. mit konz. Salzsäure bei 80° im abgeschlossenen Gefäß, dampft anschließend die Salzsäure ab, nimmt den gelb gefärbten Rückstand in wenig Wasser auf und filtriert über eine mit Wasser eingeschlämmte Säule aus saurem Aluminiumoxid, so erhält man ein Eluat, in dem papierchromatographisch N-Methylvalin und N-Methylalanin neben wenig Sarkosin nachzuweisen sind (89). Daß keine Peptide gefunden wurden, deutet daraufhin, daß die Bindung zwischen Sarkosin und N-Methylvalin bzw. Sarkosin und N-Methylalanin endständig ist.

Um auszuschließen, daß das in geringer Menge nachgewiesene Sarkosin endständig ist, sollte Actinomycin Z_1 unter gleichen Bedingungen umgesetzt werden. Dabei müßte neben wenig Mono-seco-actinomycin Z_1 (90) hauptsächlich Bis-seco-actinomycin Z_1 (91) entstehen. In beiden müßte die Lactonbindung noch erhalten sein. Um am einfachsten zu den einheitlichen Verbindungen zu kommen, sollte das Reaktionsprodukt elektrophoretisch in saurem Medium getrennt werden, wobei nur die basische Gruppen enthaltenden Seco-actinomycine wandern dürften. Nach milder alkalischer Lactonspaltung sollte dann auf Aminosäuren geprüft werden; dabei dürften nur die entweder an der α- oder an der ß-Peptidkette endständigen Aminosäuren nachzuweisen sein.

Erhitzt man Actinomycin Z_1 (87) 25 Min. bei 80° mit konz. Salzsäure, dampft i. Vak. zur Trockne ein und unterwirft das in wenig Wasser gelöste Rohprodukt bei pH 1.9 (Ameisensäure/Essigsäure-Puffer) der Hochspannungselektrophorese, so wandern zwei Zonen



zur Kathode; die Hauptmenge bleibt am Startplatz zurück. Der Inhaltsstoff der Zone mit der größeren Wanderungsgeschwindigkeit (Bis-seco-actinomycin Z_1; 5 mg aus 100 mg Z_1) (91) und der der Zone mit der kleineren Wanderungsgeschwindigkeit (Mono-seco-actinomycin Z_1; 25 mg aus 100 mg Z_1) (90) werden mit Methanol eluiert, die Eluate i. Vak. eingedampft und über festem Kaliumhydroxid getrocknet.

Beide Seco-actinomycine versetzt man nach Hydrieren des Chromophors mit 0.1 n NaOH und hält vier Stunden bei Raumtemperatur. Nach Ansäuern dampft man zur Trockne ein, trennt die Aminosäure- bzw. Peptidfraktion an saurem Aluminiumoxid durch Eluieren mit Wasser von den farbigen Produkten ab und bestimmt die im wäßrigen Eluat enthaltenen Aminosäuren. Aus Mono-seco-actinomycin Z_1 (90) ist nur N-Methylvalin abgespalten worden, aus Bis-seco-actinomycin Z_1 (91) N-Methylvalin und N-Methylalanin. Sarkosin ist nicht mehr nachzuweisen.

Erstaunlich ist, daß unter diesen Bedingungen, bei denen Actinomycin C_3 fast nur Bis-seco-actinomycin C_3[34] liefert, beim Actinomycin Z_1 vorwiegend Mono-seco-actinomycin Z_1 (90) gebildet wird. Da in diesem ausschließlich die Bindung zwischen Sarkosin und N-Methylvalin gespalten ist (ein Mono-seco-actinomycin Z_1 mit Spaltung zwischen Sarkosin und N-Methylalanin wurde nicht gefunden), muß angenommen werden, daß die Bindung zwischen Sarkosin und N-Methylalanin der sauren Hydrolyse gegenüber sehr viel beständiger ist als die Bindung zwischen Sarkosin und N-Methylvalin.

Aus den erhaltenen Ergebnissen geht eindeutig hervor, daß im Actinomycin Z_1 Threonin bzw. N-Methylthreonin mit N-Methylvalin bzw. N-Methylalanin lactonartig verknüpft sind und daß N-Methylalanin und N-Methylvalin säureamidartig mit Sarkosin verbunden sind.

Da man annehmen kann, daß Threonin und N-Methylthreonin direkt am Chromophor gebunden sind - denn anderenfalls wäre die große Unbeständigkeit dieser Aminohydroxysäuren bei der sauren Totalhydrolyse des Actinomycins Z_1 nicht zu erklären - ist somit bereits die Sequenz bis auf Valin und die prolinanalogen Komponenten festgestellt.

Da ein Beweis für die Stellung von Valin und den Prolinkomponenten nur durch einen mit großen Substanzmengen verbundenen Abbau mit verdünnter Säure möglich ist, muß die Sequenz dieser Bausteine im Actinomycin Z_1 vorläufig offen bleiben. Man kann jedoch mit einiger Sicherheit annehmen, daß Actinomycin Z_1 auch hier dem Bauplan der Actinomycine (Abbild. 1) gehorcht. Damit entspricht die Sequenz der Aminosäurebausteine des Actinomycins Z_1 völlig der aus Analogieschlüssen erhaltenen Sequenz in der Strukturformel 87.

Da Actinomycin Z_1 drei "aniso"-Stellen im Molekül enthält, also an drei Stellen des α- und ß-Peptidlactonrings mit unterschiedlichen Aminosäurebausteinen besetzt ist, erhebt sich die Frage, ob die Verteilung dieser Aminosäuren auf die α- oder ß-Kette

statistisch erfolgt oder ob die Zelle speziell eins der theoretisch möglichen acht isomeren Z_1-Actinomycine aufbaut.

Bei den bisher untersuchten aniso-Actinomycinen C_2 und X_2, die sich allerdings nur in einem Aminosäurebaustein der α- und ß-Peptidkette unterscheiden (s. Bauplan der Actinomycine; Abbild. 1), ist sicher nachgewiesen worden, daß keine Isomerengemische, sondern einheitliche Verbindungen vorliegen.

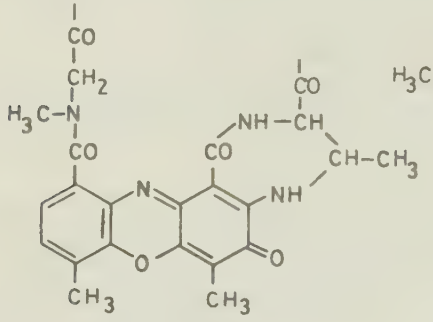
Den ersten Anhaltspunkt für die Verteilung der Aminosäuren des Actinomycins Z_1 auf die α- und ß-Peptidlactonringe erhielt ich bei der Untersuchung der Actinomycin Z_1-Säuren.

Wie oben schon erwähnt, hatte A. Boiteux[30] bei der Darstellung der Actinomycin C_3-Säuren unter hydrierenden Bedingungen stets Produkte erhalten, bei denen die langwellige Bande im UV-Spektrum von 442 mμ nach 459 mμ verschoben ist. G. Döring deutete diesen Befund, indem er annahm, daß eine Bindung zwischen dem ß-Kohlenstoffatom des Threonins und der Aminogruppe des Chromophors eintritt (64). Bei der Actinomycin C_3-Säure B V, die kein Threonin mehr enthält, sondern ein Mol Aminobuttersäure am benzoiden Teil des Chromophors und am chinoiden Teil den Siebenring, tritt die langwellige Verschiebung ebenfalls auf.

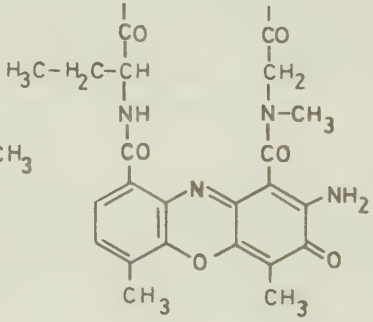
Nimmt man einmal an, daß im Actinomycin Z_1 der Threoninrest am chinoiden Teil des Chromophors und der N-Methylthreoninrest am benzoiden Teil des Chromophors steht, so müßten bei der Darstellung der Actinomycinsäuren unter hydrierenden Bedingungen der N-Methylthreoninrest im Verlaufe einer Retroaldolreaktion in den Sarkosinrest übergehen und der Threoninrest in den Siebenring umgewandelt werden. In den erhaltenen Actinomycinsäuren (92) dürfte also keine Aminobuttersäure nachweisbar sein; außerdem müßte das UV-Spektrum die langwellige Verschiebung der Bande bei 442 mμ zeigen.

Man kann jedoch in den Actinomycinsäuren Z_1-S_5 und Z_1-S_6 sowohl ein Mol Aminobuttersäure als auch ein zusätzliches Mol Sarkosin nachweisen. Das bedeutet, daß der N-Methylthreoninrest am chinoiden Teil des Chromophors stehen muß; denn hier kann

sich infolge des durch Retroaldolreaktion entstehenden Sarkosinrestes der Siebenring nicht mehr ausbilden. Infolgedessen tritt auch keine Verschiebung der Banden im UV-Spektrum auf. Der Threoninrest am benzoiden Teil des Chromophors wird in den Aminobuttersäurerest umgewandelt (93).



92



93

Im Actinomycin Z_1 befindet sich daher mit größter Wahrscheinlichkeit N-Methylthreonin an der ß-Peptidkette und Threonin an der α-Peptidkette.

Einen weiteren Anhaltspunkt für die Verteilung der ungleichen Aminosäurepaare auf die Peptidketten des Actinomycins Z_1 erhielt ich durch Befunde von E. Katz und Mitarbeitern[35]. Sie hatten gezeigt, daß das in Actinomycinen enthaltene Sarkosin nicht als solches, sondern nur als Glycin in den Peptidverband der Actinomycine eingebaut wird. Dann erst erfolgt Methylierung.

Nimmt man einmal an, daß die N-Methylierung bei den Z-Actinomycinen ebenfalls erst nach der Peptidverknüpfung erfolgt, so wird in der Kette, in der zunächst Glycin mit Valin und dies lactonartig mit Threonin verbunden ist (94), wie in allen anderen bekannten Actinomycinen Glycin zu Sarkosin und Valin zu N-Methylvalin methyliert. Threonin bleibt unverändert (95).

In der anderen Kette steht das um eine Methylgruppe ärmere Alanin (96). Das methylierende Agens könnte hier ebenfalls Glycin

94 95

und Alanin methylieren, außerdem jedoch auch das Threonin, da N-Methylalanin weniger Platz beansprucht als N-Methylvalin (97).

96 97

Trifft diese Theorie zu, dann müßte N-Methylalanin, da es mit N-Methylthreonin verbunden ist, ebenfalls im ß-Peptidlactonring des Actinomycins Z_1 stehen. Es bliebe lediglich noch die Frage zu klären, wie die beiden Prolinbausteine auf die beiden Peptidlactonringe verteilt sind. An eine Beantwortung dieser Frage kann erst nach einem halbseitigen Abbau gedacht werden.

III. Die Z_S-Actinomycine

1. Vorbemerkungen

Nachdem die Struktur des Actinomycins Z_1 bekannt war, sollte festgestellt werden, wie die anderen Z-Actinomycine aufgebaut sind, d. h. also, in welchem Maße die Actinomycin Z bildende Zelle das Molekül variieren kann.

Bei den bisher bekannten nativen Actinomycingemischen waren innerhalb eines Stammes Variationen lediglich an einer Stelle des Peptidteils möglich. So konnte in den Actinomycin C bildenden Stämmen nur D-Valin gegen D-allo-Isoleucin ausgetauscht werden. Bei den Actinomycin C_1 produzierenden Mikroorganismen tritt noch eine C_0-Fraktion auf, bei der Variationen an den Prolinbausteinen vorliegen.

Bei den Actinomycin X-Bildnern schließlich beruht eine Vielzahl von Variationen ausschließlich auf Änderungen an den Prolinbausteinen, die durch Oxoprolin, Sarkosin und Hydroxyprolin ausgetauscht werden können.

Auch bei den Z-Actinomycinen sollte man immer den gleichen Grundbautyp erwarten; Variationen sollten nur an einem Baustein jeder Peptidkette auftreten.

Interessant war weiterhin, festzustellen, wie sich die antibiotische Wirksamkeit innerhalb der Reihe der Z-Actinomycine ändert.

2. Actinomycin Z_S-Gemisch

Das in Submerskulturen des Stammes ETH 20675 zum größten Teil vorhandene Actinomycin Z_1 läßt sich an Aluminiumoxidsäulen durch Eluieren mit Essigester von einer schneller wandernden Zone (enthaltend die Z_S-Actinomycine) und einer erst mit Methanol eluierbaren Zone (enthaltend die Z_0-Actinomycine) abtrennen. Untersucht man das erhaltene Actinomycin Z_S-Gemisch papierchromatographisch, so kann man im System Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. wäßr. Kresotinat (3:1:4) sieben Zonen nachweisen. Der Inhaltsstoff der Zone mit dem kleinsten R_F-Wert ist identisch

mit Actinomycin Z_1. Die in den übrigen sechs Zonen enthaltenen Actinomycine liegen in sehr unterschiedlicher Menge vor. Vier sind auf dem Chromatogramm recht gut zu erkennen (Actinomycine Z_2, Z_3, Z_4 und Z_5; nach steigendem R_F-Wert durch arabische Ziffern gekennzeichnet). Zwischen Actinomycin Z_1 und Actinomycin Z_2 liegt noch eine sehr schwache Nebenzone (Actinomycin Z_{1a}), ebenso zwischen Actinomycin Z_2 und Actinomycin Z_3 (Actinomycin Z_{2a}). Sehr schwache Nebenzonen mit größeren R_F-Werten als Actinomycin Z_5 kann man an einer Cellulosepulversäule erkennen, jedoch ist es fraglich, ob die in diesen Zonen enthaltenen Stoffe noch Actinomycine sind.

Die prozentualen Anteile der einzelnen Z_S-Actinomycine in einem von der Hauptmenge Actinomycin Z_1 abgetrennten Actinomycin Z_S-Gemisch können im Mittel durch folgende Zahlen wiedergegeben werden:

Actinomycin Z_1	:	15 %
Actinomycin Z_2	:	30 %
Actinomycin Z_3	:	10 %
Actinomycin Z_4	:	35 %
Actinomycin Z_5	:	8 %
sonstige Actinomycine	:	2 %

Einen sehr interessanten Befund machte ich, als ich versuchte, die Auftrennung der "schnellen" Z-Actinomycine vom Papierchromatogramm auf eine Cellulosepulversäule zu übertragen, um grössere Mengen der reinen Komponenten zu erhalten. Es trennten sich zwar zwei sehr schwache Zonen und eine intensivere Zone ab, die Hauptmenge blieb jedoch in einer breiten, roten, sich immer mehr in die Länge ziehenden Zone ungetrennt.

Der Inhaltsstoff der abgetrennten Zone erwies sich im Papierchromatogramm als reines Actinomycin Z_5. In der breiten, roten Hauptzone waren nach Aufarbeitung kaum noch Inhaltsstoffe mit den R_F-Werten von Actinomycin Z_4 und Actinomycin Z_3 zu erkennen, dafür hatte jedoch die Menge der Zone mit dem R_F-Wert des Actinomycins Z_2 erheblich zugenommen.

Die Actinomycine Z_4 und Z_3 scheinen sich also unter diesen Bedingungen zu zersetzen oder umzuwandeln und in Produkte mit dem R_F-Wert des Actinomycins Z_2 überzugehen.

An Cellulosepulversäulen läßt sich deshalb nur Actinomycin Z_5 sauber abtrennen, wohingegen die übrigen Z_S-Actinomycine teilweise zersetzt oder umgewandelt werden. Da diese Umwandlungsprodukte schwer zu trennen sind und von ihnen aus auch kaum Rückschlüsse auf die ursprünglich vorhandenen Actinomycine gezogen werden können, mußte nach anderen Trennungsverfahren gesucht werden.

Bereits W. Keller-Schierlein und Mitarbeiter[21] hatten bei der Untersuchung des Z-Actinomycins festgestellt, daß sich bei einer Craig-Verteilung nur Actinomycin Z_5 von den Actinomycinen Z_2, Z_3 und Z_4 abtrennen läßt. Die Actinomycine Z_2, Z_3 und Z_4 sind also auch durch Gegenstromverteilung nicht trennbar. Auch dies ist ein Beweis dafür, daß sie chemisch sehr eng verwandt sind.

Die einzige Möglichkeit, die Actinomycine Z_2, Z_3 und Z_4 voneinander zu trennen, bietet anscheinend das Papierchromatogramm. Hier ist die Wanderungsgeschwindigkeit schneller als die Umwandlungsgeschwindigkeit. Da man etwa 10 mg Actinomycin Z_S-Gemisch pro Papierbogen trennen kann, wurden 1 g dieses Gemisches auf 100 Bogen im System Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. wäßr. Kresotinat (3:1:4) aufgetrennt, die Inhaltsstoffe der Hauptzonen Z_1, Z_2, Z_3, Z_4 und Z_5 mit Methanol/Wasser (3:1) eluiert, die Eluate etwas eingeengt, zwischen Chloroform und wäßr. Natriumhydrogencarbonat verteilt, um die Kresotinsäure zu entfernen und i. Vak. zur Trockne eingedampft. Die papierchromatographische Untersuchung der Rückstände zeigt, daß das eluierte Actinomycin Z_5 noch durch geringe Mengen Actinomycin Z_4 sowie durch Produkte mit größeren R_F-Werten als Actinomycin Z_5 verunreinigt ist. Die Fraktionen, die reines Actinomycin Z_3 und Actinomycin Z_4 enthalten sollen, sind beide durch etwa gleichgroße Mengen einer Komponente verunreinigt, die im Papierchromatogramm den gleichen R_F-Wert wie Actinomycin Z_2 besitzt.

Das bedeutet, daß während der Laufzeit des Papierchromatogramms und während der Aufarbeitung die Actinomycine Z_3 und Z_4 zur Hälfte in Produkte mit dem R_F-Wert des Actinomycins Z_2 umgewandelt werden.

Actinomycin Z_2 ist ebenfalls nicht chromatographisch einheitlich erhalten worden, sondern zeigt im Papierchromatogramm zwei schwache Zonen mit geringeren R_F-Werten.

Obwohl also durch präparative Papierchromatographie keines der vier Z_S-Actinomycine chromatographisch einheitlich erhalten wird, ist es doch gelungen, neben fast reinem Actinomycin Z_5 Präparate zu erhalten, die an Actinomycin Z_4, Z_3 und Z_2 stark angereichert sind.

3. Actinomycin Z_5

Da die durch Papierchromatographie erhaltene Actinomycin Z_5-Fraktion am wenigsten verunreinigt war, sollte zunächst versucht werden, sie zu reinigen und zu charakterisieren. Das Rohprodukt wurde an einer Cellulosepulversäule im System Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. Kresotinatlösung (3:1:4) chromatographiert. Dabei bildet sich neben zwei schwachen Vorzonen und einer sehr langsam wandernden Zone eine scharf abgegrenzte, rote Zone aus. Ihr Inhaltsstoff wurde mit Methanol eluiert, in üblicher Weise von Kresotinsäure befreit und aus Benzol an einer Säule aus Aluminiumoxid IV adsorbiert. Beim Nachwaschen mit Essigester wandert eine breite, rote Zone in die Vorlage. Der nach Abdampfen des Essigesters hinterbliebene Rückstand kristallisiert aus Benzol/Cyclohexan in kleinen, roten Prismen vom Schmelzpunkt 257°. Das erhaltene kristalline Actinomycin Z_5 erweist sich in den Systemen Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. Kresotinat (3:1:4) und (2:1:3) als einheitlich. Sein R_F-Wert entspricht dem von Actinomycin E_2, ist also um etwa 30 % größer als der von Actinomycin C_3. Actinomycin Z_5 ist antibiotisch bis zur Verdünnung 1 : 6.4 Mill. gegen Bac. subtilis wirksam.

Nach salzsaurer Hydrolyse wurden folgende Aminosäuremengen nachgewiesen:

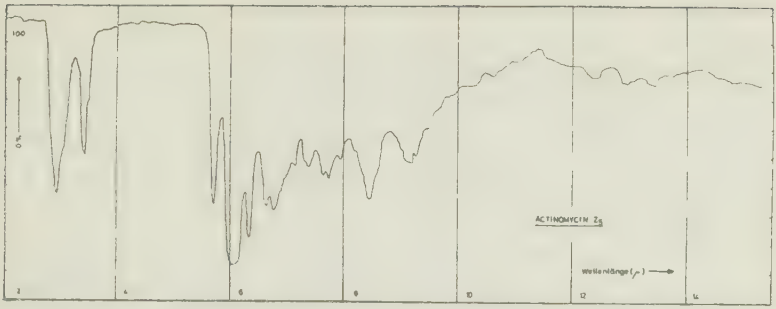
1 Mol N-Methylvalin
1 Mol N-Methylalanin
2 Mol Sarkosin
1 Mol 5-Methylprolin
2 Mol Valin
2 Mol Threonin

Da man beim 5-Methylprolin nicht ganz sicher sein konnte, ob nicht auch 4- oder 3-Methylprolin den gleichen R_F-Wert im Papierchromatogramm haben, wurde in qualitativen Aminosäurebestimmungen durch Vergleich der im Hydrolysat von Actinomycin Z_5 gefundenen Aminosäure mit 5-, 4- und 3-Methylprolin chromatographisch und pherographisch nochmals eindeutig festgestellt, daß das in Actinomycin Z_5 enthaltene Methylprolin ein 5-Methylprolin ist. Über die Konfiguration dieser Aminosäure im Actinomycin Z_5 ist vorläufig nichts bekannt.

W. Keller-Schierlein und Mitarbeiter[21] hatten bei der Untersuchung des Actinomycins Z_5 diese 5-Methylprolinkomponente nicht gefunden. Das liegt wohl daran, daß 5-Methylprolin mit Ninhydrin nur unter Bildung einer blaßgelben Farbe reagiert. Deutlich kann man diese Aminosäure erst nach Entwickeln mit Isatin nachweisen, wobei eine blaue Farbe entsteht, die allerdings auch nicht mehr ganz so intensiv ist wie die beim Entwickeln von Prolin mit Isatin entstehende tiefblaue Farbe.

J. H. Manegold[14] isolierte aus Kulturen der Stämme SV 1810 a und SV 1784 das Actinocinylpeptid R_2, in dessen Totalhydrolysat er nach Entwickeln mit Isatin eine Prolinkomponente fand, die er für 4-Methylprolin hielt. Da aus Kulturen des Stammes SV 1784 ebenfalls Actinomycin H_5 (identisch mit Actinomycin Z_1) isoliert wurde, kann wohl mit Sicherheit angenommen werden, daß es sich bei dem gefundenen Prolinderivat ebenfalls um 5-Methylprolin und nicht um 4-Methylprolin handelt.

Das IR-Spektrum des Actinomycins Z_5 (Abbild. 9) entspricht in der Lage und Intensität der Banden vollkommen dem des Actinomycins Z_1. Auch das UV-Spektrum ist mit dem anderer Actinomycine



Abbild. 9 IR-Spektrum von Actinomycin Z_5 (in KBr)

vollkommen identisch. Daraus kann man mit Sicherheit schließen, daß der Chromophor des Actinomycins Z_5 Actinocin ist.

Damit sind der Chromophor und neun Aminosäurebausteine des Actinomycins Z_5 bekannt. Da angenommen werden muß, daß Actinomycin Z_5 wie alle antibiotisch wirksamen Actinomycine ebenfalls zehn Aminosäurereste im Peptidteil enthält, war eine Aminosäure bei der sauren Totalhydrolyse zerstört worden.

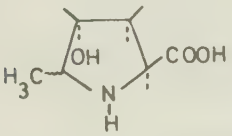
Um diese Aminosäure zu identifizieren, wurden zunächst Acetylierungsversuche durchgeführt. Behandelt man Actinomycin Z_5 12 Stunden mit Acetanhydrid/Pyridin (2:1) und dampft i. Vak. zur Trockne ein, so zeigt der Rückstand im Papierchromatogramm den gleichen R_F-Wert wie das Ausgangsprodukt. Im Actinomycin Z_5 ist also keine acetylierbare Gruppe vorhanden.

Reduziert man Actinomycin Z_5 nach Meerwein-Ponndorf mit Aluminiumisopropylat in Isopropanol/Benzol, verdünnt anschließend die tiefgrüne Lösung mit Chloroform und zerstört das Aluminiumisopropylat mit 2n H_2SO_4, so erhält man ein Rohprodukt, in dem papierchromatographisch kein Actinomycin Z_5 mehr nachzuweisen ist. Dafür erkennt man zwei neue Zonen mit kleineren R_F-Werten (Z_5-I und Z_5-II; nach steigendem R_F-Wert durch römische Ziffern gekennzeichnet).

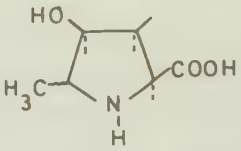
Nach papierchromatographischer Trennung im System Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. Kresotinatlösung (3:1:4) und anschliessendem Umfällen aus Chloroform/Petroläther erhält man die reinen

Actinomycine Z_5-I und Z_5-II als rote, amorphe Pulver. Die Ausbeute an Z_5-I ist etwa doppelt so groß wie die an Z_5-II. Das UV-Spektrum von beiden Verbindungen ist mit dem von Actinomycin Z_5 identisch; Veränderungen am Chromophor sind also nicht eingetreten. Beide Actinomycine sind antibiotisch wirksam, Z_5-I bis zur Verdünnung 1 : 1.4 Mill. und Z_5-II bis zur Verdünnung 1 : 2.8 Mill. gegen Bac. subtilis.

In den Totalhydrolysaten von Actinomycin Z_5-I und Actinomycin Z_5-II konnte chromatographisch eine nach Entwickeln mit Isatin und p-Dimethylaminobenzaldehyd[36] rot werdende Zone entdeckt werden, die den gleichen R_F-Wert wie 4-Hydroxy-5-methylprolin besitzt. Im Pherogramm erwies sich das in Actinomycin Z_5-I enthaltene mit der trans-Verbindung 10, das in Z_5-II enthaltene mit der cis-Verbindung 11 identisch.



10

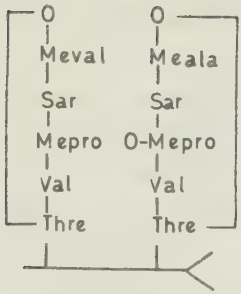


11

Aus diesen Ergebnissen kann man mit Sicherheit schließen, daß im Actinomycin Z_5 4-Oxo-5-methylprolin als zehnter Aminosäurebaustein enthalten ist. Bei Reduktion nach Meerwein-Ponndorf entsteht daraus hauptsächlich 4-Hydroxy-5-methylprolin in der trans-Form 10 neben wenig 4-Hydroxy-5-methylprolin in der cis-Form 11.

Damit sind sämtliche Bausteine des Actinomycins Z_5 bekannt. Nach der beim Actinomycin Z_1 durchgeführten Sequenzanalyse ergibt sich die Struktur des Actinomycins Z_5 (99); denn es sind bis jetzt innerhalb eines Actinomycin bildenden Stammes keine Actinomycine mit unterschiedlicher Sequenz gefunden worden.

Hier ist also ein Z-Actinomycin gefunden worden, bei dem N-Methylalanin mit Threonin statt mit N-Methylthreonin verbunden ist. Die Methylierung des mit N-Methylalanin verbundenen Threonins hat hier also nicht eingesetzt. Da Actinomycin Z_5 jedoch nur in



99

ganz geringem Ausmaß gebildet wird, muß man annehmen, daß es sich hier um einen von der Actinomycin Z bildenden Zelle nur in geringem Ausmaß durchgeführten Syntheseweg handelt.

4. Die Actinomycine Z_4, Z_3 und Z_2

a) Actinomycin Z_4

Die durch präparative Papierchromatographie erhaltene Actinomycin Z_4-Fraktion zeigt im Papierchromatogramm außer Actinomycin Z_4 eine starke Zone vom R_F-Wert des Actinomycins Z_2, deren Inhaltsstoff als Umwandlungsprodukt von Actinomycin Z_4 aufzufassen ist. Dieses Umwandlungsprodukt läßt sich am besten nach Adsorption an Aluminiumoxid abtrennen. Beim Eluieren mit Essigester wandert eine breite, rote Zone in die Vorlage, die fast reines Actinomycin Z_4 enthält. Das Umwandlungsprodukt läßt sich erst mit Methanol eluieren.

Das nach Abdampfen des Essigesters erhaltene Actinomycin Z_4 zeigt im Papierchromatogramm immer noch eine sehr schwache Zone vom R_F-Wert des Actinomycins Z_2, die auch durch Kristallisation aus Essigester/Cyclohexan nicht abgetrennt werden kann.

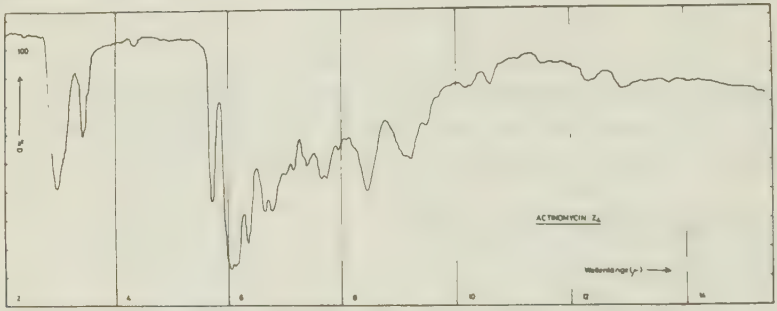
Actinomycin Z_4 ist antibiotisch bis zur Verdünnung 1:12.8 Mill. gegen Bac. subtilis wirksam. Sein IR-Spektrum (Abbild. 10) ist dem anderer Actinomycine analog; der R_F-Wert entspricht dem von

Actinomycin E_1.

In quantitativen Aminosäurebestimmungen wurden gefunden:

1 Mol Threonin
2 Mol Valin
2 Mol Sarkosin
1 Mol 5-Methylprolin
1 Mol N-Methylvalin
1 Mol N-Methylalanin.

Da nach dem UV-Spektrum der Chromophor des Actinomycins Z_4 Actinocin ist, sind damit der Chromophor und acht Aminosäuren bekannt.



Abbild. 10 IR-Spektrum von Actinomycin Z_4 (in KBr)

Aus den N-Methylbestimmungen (5.27 %; d. s. 4.5 N-CH_3) und aus der Integration der N-Methyle im NMR-Spektrum (15 Protonen) geht hervor, daß in einer dem Nachweis entgangenen Aminosäure noch eine N-Methylgruppe vorliegen muß. Daraus kann wohl mit einiger Sicherheit geschlossen werden, daß im Actinomycin Z_4 ebenso wie im Actinomycin Z_1 N-Methylthreonin als zweite Aminohydroxysäure vorliegt. Abbauversuche, wie sie beim Actinomycin Z_1 durchgeführt wurden, kamen aus Substanzmangel nicht in Betracht.

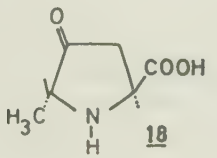
Actinomycin Z_4 bleibt beim Behandeln mit Acetanhydrid/Pyridin unverändert, besitzt also keine acetylierbare Gruppe.

Nach Reduktion mit Aluminiumisopropylat entsteht aus Actinomycin Z_4 ein Actinomycingemisch, das sich im Papierchromatogramm in zwei Hauptzonen (Z_4-I und Z_4-II; nach steigendem

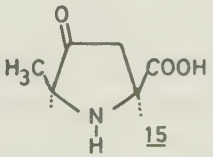
R_F-Wert durch römische Ziffern gekennzeichnet) und drei sehr schwache Nebenzonen auftrennt. Actinomycin Z_4 ist nicht mehr nachzuweisen. Actinomycin Z_4-I und Actinomycin Z_4-II, im Verhältnis 5 : 1 entstanden, wurden durch präparative Papierchromatographie von den entstandenen Nebenprodukten abgetrennt.

Im Hydrolysat von Actinomycin Z_4-I konnte pherographisch 4-Hydroxy-5-methylprolin in der trans-Form (10), in dem von Actinomycin Z_4-II 4-Hydroxy-5-methylprolin in der cis-Form (11) nachgewiesen werden.

Da im Gegensatz zum Actinomycin Z_1, bei dem die Reduktion in annähernd gleicher Ausbeute zu den Reduktionsprodukten mit cis- und trans-4-Hydroxy-5-methylprolinbausteinen führt, hier vorwiegend das Actinomycin Z_4-I mit trans-4-Hydroxy-5-methylprolin im Peptidverband entsteht, kann man annehmen, daß die Methylgruppe am C_5 des 4-Oxo-5-methylprolinbausteins zur Carboxygruppe an C_2 cis-ständig (15) und nicht wie im Actinomycin Z_1 transständig (18) ist.

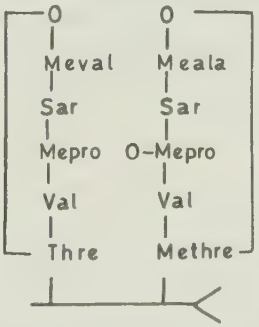


18



15

Im Actinomycin Z_4 liegt also als zehnter Aminosäurebaustein



100

1 Mol 4-Oxo-5-methylprolin, wahrscheinlich in der relativen Konfiguration der Formel 15, vor. Damit sind alle Aminosäurebausteine bekannt und es ergibt sich für Actinomycin Z_4 nach der beim Actinomycin Z_1 durchgeführten Sequenzanalyse die Strukturformel 100.

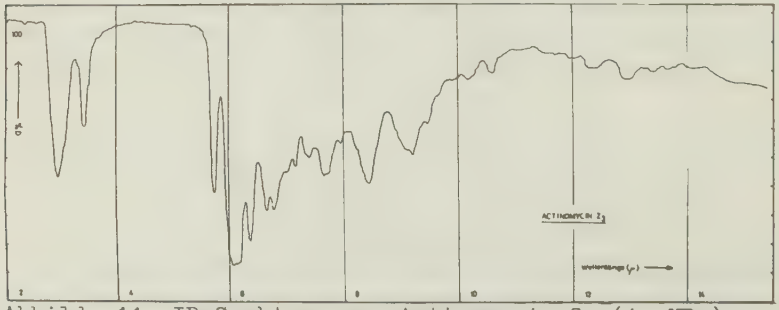
b) Actinomycin Z_3

Das nach präparativer Papierchromatographie erhaltene Actinomycin Z_3 ist wie Actinomycin Z_4 durch ein Produkt verunreinigt, das im Papierchromatogramm den gleichen R_F-Wert wie Actinomycin Z_2 hat. Diese Verunreinigung kann wie beim Actinomycin Z_4 durch Chromatographie an Aluminiumoxid abgetrennt werden. Beim Eluieren mit Essigester wandert chromatographisch einheitliches Actinomycin Z_3 in die Vorlage. Das Umwandlungsprodukt kann erst mit Methanol von der Säule gewaschen werden.

Actinomycin Z_3 kristallisiert aus Benzol/Cyclohexan in kleinen Prismen, ist antibiotisch bis zur Verdünnung 1 : 3.2 Mill. gegen Bac. subtilis wirksam und im IR-Spektrum (Abbild. 11) und UV-Spektrum völlig mit Actinomycin Z_4 identisch. Der R_F-Wert des Actinomycins Z_3 ist etwa so groß wie der von Actinomycin C_3.

Die bei der quantitativen Aminosäurebestimmung erhaltenen Werte entsprechen denen beim Actinomycin Z_4. Gefunden wurden:

1 Mol Threonin
2 Mol Valin
1 Mol 5-Methylprolin
2 Mol Sarkosin
1 Mol N-Methylvalin und
1 Mol N-Methylalanin.

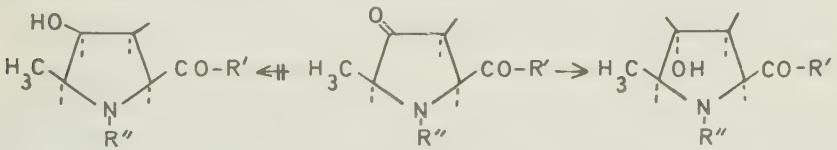


Abbild. 11 IR-Spektrum von Actinomycin Z_3 (in KBr)

Durch Acetylierung mit Acetanhydrid/Pyridin (2:1) wird Actinomycin Z_3 nicht verändert.

Nach Meerwein-Ponndorf-Reduktion des Actinomycins Z_3 erkennt man im Papierchromatogramm vier Zonen (Z_3-I bis Z_3-IV; nach steigendem R_F-Wert durch römische Ziffern gekennzeichnet), von denen zwei (Z_3-I und Z_3-III) sehr schwache Nebenzonen, eine (Z_3-IV) etwa 25 % der eingesetzten Substanz und die Hauptzone (Z_3-II) etwa 60 % der eingesetzten Substanz enthält.

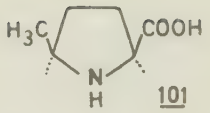
In Z_3-II wurde 4-Hydroxy-5-methylprolin in der trans-Form 10 gefunden, in Z_3-IV 4-Hydroxy-5-methylprolin in der cis-Form 11. Da hauptsächlich Z_3-II mit trans-Konfiguration bei der Meerwein-Ponndorf-Reduktion des Actinomycins Z_3 erhalten wurde, kann man vermuten, daß die relative Konfiguration des 4-Oxo-5-methylprolinrestes im Actinomycin Z_3 wie beim Actinomycin Z_4 mit 15 anzugeben ist. Denn aus 15 sollte bei der Reduktion aus sterischen Gründen mehr von einem dem trans-4-Hydroxyprolin entsprechenden 4-Hydroxy-5-methylprolin 17 entstehen.



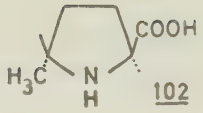
16 15 17

Durch N-Methylbestimmungen (5.85 %; entsprechend 4.9 N-CH_3) und Integration der N-Methyle des NMR-Spektrums (15 Protonen) erhält man einen Anhaltspunkt dafür, daß die letzte noch unbekannte Komponente des Actinomycins Z_3 eine N-Methylgruppe enthält. Damit ist wahrscheinlich auch im Actinomycin Z_3 N-Methylthreonin enthalten.

Aus den Aminosäurebestimmungen läßt sich zwischen Actinomycin Z_3 und Actinomycin Z_4 nicht unterscheiden. Es könnte möglich sein, daß der unterschiedliche R_F-Wert auf unterschiedliche Konfiguration des 5-Methylprolins beruht, das einmal in der allo-Form (101) und zum anderen in der D.L-Form (102)vorliegen könnte.



101



102

Andererseits wäre es auch möglich, daß die Verteilung der Aminosäuren auf die beiden Peptidlactonringe in den Actinomycinen Z_3 und Z_4 unterschiedlich ist. Genauere Untersuchungen liegen hier noch nicht vor.

c) Actinomycin Z_2

Actinomycin Z_2, durch präparative Papierchromatographie aus Actinomycin Z_S-Gemisch gewonnen, zeigt im Papierchromatogramm noch zwei Zonen mit geringeren R_F-Werten. Versucht man, Actinomycin Z_2 an Aluminiumoxid IV zu chromatographieren, um es von diesen Verunreinigungen zu befreien, so stellt man fest, daß es im Gegensatz zu dem im Actinomycin Z_S-Gemisch enthaltenen Actinomycin Z_2 nicht mehr mit Essigester, sondern erst mit Aceton eluiert werden kann.

Daraus könnte man schließen, daß das ursprünglich vorhandene Actinomycin Z_2 sich bei der präparativen Papierchromatographie vollständig verändert und in ein Umwandlungsprodukt mit gleich großem R_F-Wert übergeht. Es könnte allerdings auch möglich sein, daß das Actinomycin Z_2 von den übrigen schnellen Z-Actinomycinen mitgeschleppt wird.

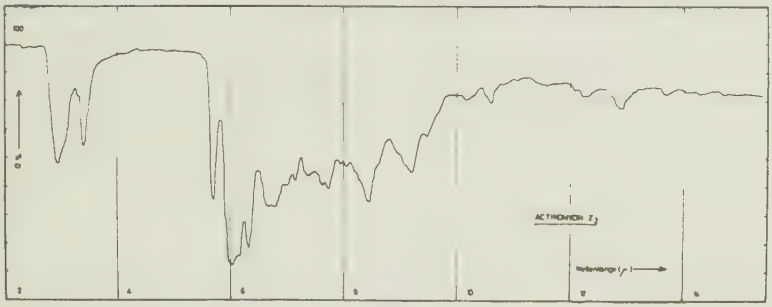
Da die Menge der Zersetzungsprodukte noch anwächst, wenn man Actinomycin Z_2 an Aluminiumoxid IV chromatographiert, wird es nur gründlich mit Wasser gewaschen, getrocknet und aus Benzol/Cyclohesan kristallisiert. Dabei entstehen große Prismen mit gleicher Kantenlänge.

Das so erhaltene Actinomycin Z_2 ist papierchromatographisch einheitlich. Es ist antibiotisch bis zur Verdünnung 1 : 1.6 Mill. gegen Bac. subtilis wirksam. Sein R_F-Wert ist etwas kleiner als

der von Actinomycin X_2 und etwas größer als der von Actinomycin C_1. IR-Spektrum (Abbild. 12) und UV-Spektrum sind dem von anderen Actinomycinen analog. Quantitative Aminosäurebestimmungen haben das gleiche Ergebnis wie bei den Actinomycinen Z_3 und Z_4; es werden

1 Mol Threonin
2 Mol Valin
1 Mol 5-Methylprolin
2 Mol Sarkosin
1 Mol N-Methylvalin und
1 Mol N-Methylalanin

gefunden.



Abbild. 12 IR-Spektrum von Actinomycin Z_2 (in KBr)

N-Methylbestimmungen und die Integration des NMR-Spektrums deuten auf 5 N-Methylgruppen. Der neunte Aminosäurebaustein des Actinomycins Z_2 ist damit mit ziemlicher Sicherheit N-Methylthreonin.

Actinomycin Z_2 läßt sich mit Acetanhydrid/Pyridin (2:1) in ein Produkt mit größerem R_F-Wert überführen, besitzt also eine acetylierbare Hydroxygruppe. Der R_F-Wert dieses Acetates liegt zwischen dem von Actinomycin Z_1-monoacetat und dem von Actinomycin Z_1-diacetat.

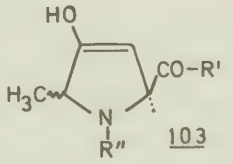
Nach Reduktion mit Aluminiumisopropylat verändert sich Actinomycin Z_2 ebenfalls. Im Papierchromatogramm ist die Zone mit dem R_F-Wert des Actinomycins Z_2 verschwunden, dafür sind drei neue Zonen annähernd gleicher Stärke mit klein-en R_F-Werten zu

erkennen (Z_2-I, Z_2-II und Z_2-III; nach steigendem R_F-Wert durch römische Ziffern gekennzeichnet).

Im Hydrolysat von Actinomycin Z_2-III konnte 4-Hydroxy-5-methylprolin in der cis-Form nachgewiesen werden; im Hydrolysat von Actinomycin Z_2-II wurde 4-Hydroxy-5-methylprolin in der trans-Form gefunden.

Damit ist im Actinomycin Z_2 als zehnter Aminosäurebaustein 4-Oxo-5-methylprolin enthalten. Da Actinomycin Z_2-II und Actinomycin Z_2-III in annähernd gleicher Menge entstehen, kann man annehmen, daß der 4-Oxo-5-methylprolinbaustein in der relativen Konfiguration der Formel 6 vorliegt. Denn aus diesem sollten wie im Actinomycin Z_1 nach der Reduktion aus sterischen Gründen gleiche Mengen der beiden diastereomeren 4-Hydroxy-5-methylproline 7 und 8 entstehen.

Actinomycin Z_2 besitzt damit die gleiche Aminosäurezusammensetzung wie die Actinomycine Z_3 und Z_4. Warum Actinomycin Z_2 acetylierbar ist, ob der 4-Oxo-5-methylprolinbaustein hier etwa in der Enolform 103 vorliegt, kann noch nicht mit Sicherheit entschieden werden.



103

IV. Die Z_0-Actinomycine

1. Auftrennung von Actinomycin Z_0-Gemisch

Beim Abtrennen von Actinomycin Z_1 von den übrigen Z-Actinomycinen auf Aluminiumoxidsäulen fällt außer der Fraktion der schnellen Z-Actinomycine noch eine Z_0-Fraktion an, die erst mit Methanol von der Säule eluierbar ist.

Im Papierchromatogramm im System Butylacetat - Butanol - Dibutyläther - 5 proz. Kresotinatlösung (6:1:1:8) trennt sich diese Z_0-Fraktion in fünf Zonen auf (Z_{01}, Z_{02}, Z_{03}, Z_{04} und Z_{05}; nach steigendem R_F-Wert durch arabische Ziffern gekennzeichnet).

Die gleichen Zonen erhält man, wenn man eine größere Menge Gemisch an einer Cellulosepulversäule im gleichen System auftrennt. Die Ausbeuten an den einzelnen Z_0-Komponenten sind ungefähr folgende:

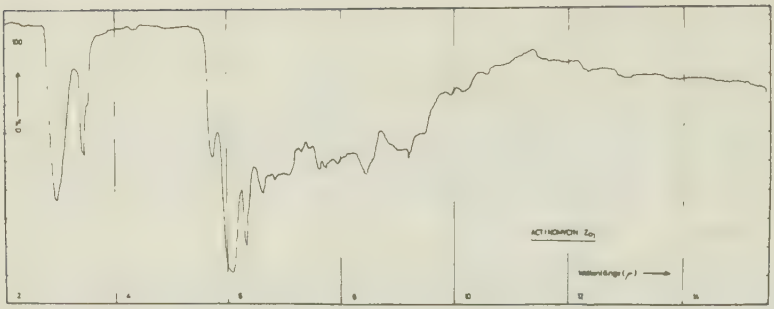
Z_{01}	:	14 %
Z_{02}	:	1 %
Z_{03}	:	22 %
Z_{04}	:	33 %
Z_{05}	:	25 %

Die Fraktion Z_{05} enthält, wie papierchromatographisch festzustellen ist, ein Gemisch mehrerer brauner und gelbbrauner Zersetzungsprodukte und wurde nicht weiter untersucht.

Die Fraktion Z_{04} zeigt im Papierchromatogramm den gleichen R_F-Wert wie Actinomycin Z_1. Da bei Acetylierung von Z_{04} Verbindungen entstehen, die den gleichen R_F-Wert wie Actinomycin Z_1-monoacetat und Actinomycin Z_1-diacetat haben, kann man mit Sicherheit annehmen, daß Z_{04} und Actinomycin Z_1 identisch sind.

2. Actinomycin Z_{01}

Papierchromatographisch einheitlich war der Inhaltsstoff der Fraktion Z_{01}. Das IR-Spektrum dieser Verbindung (Abbild. 13) ist ebenso wie das UV-Spektrum mit dem anderer Z-Actinomycine identisch. Deshalb kann man diese Verbindung, obwohl sie antibiotisch unwirksam ist, als Actinomycin bezeichnen.



Abbild. 13 IR-Spektrum von Actinomycin Z_{01} (in KBr)

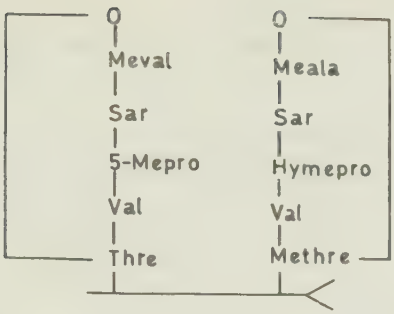
Actinomycin Z_{01} enthält im Peptidverband Threonin, Valin, Sarkosin, N-Methylvalin, N-Methylalanin und 4-Hydroxy-5-methylprolin in der trans-Form 10. Es ist nicht identisch mit Actinomycin Z_1-I, wie man auf Grund dieser Aminosäurezusammensetzung vermuten könnte, sondern besitzt einen etwas größeren R_F-Wert.

3. Actinomycin Z_{02}

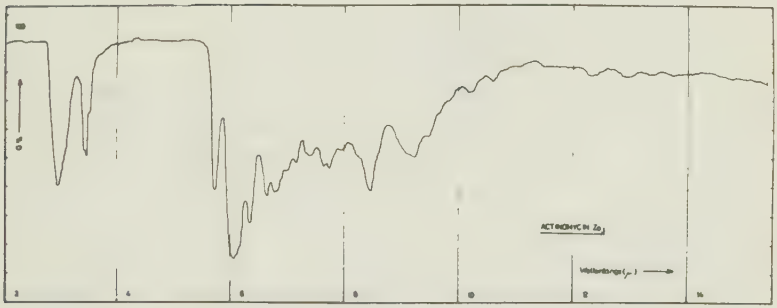
Die zweite, in äußerst kleiner Menge erhaltene Fraktion ist papierchromatographisch nicht völlig einheitlich, sondern mit etwas Actinomycin Z_{01} verunreinigt. Da insgesamt nur 2 mg erhalten worden waren, konnten lediglich qualitative Aminosäurebestimmungen durchgeführt werden. Im Totalhydrolysat fand ich die gleichen Aminosäuren wie im Actinomycin Z_{01}. Im Plattentest zeigt Actinomycin Z_{02} sehr kleine Hemmzonen.

4. Actinomycin Z_{03}

Im IR- und UV-Spektrum ist der Inhaltsstoff der Zone Z_{03} mit den übrigen Z-Actinomycinen identisch (Abbild. 14). Actinomycin Z_{03} besitzt den gleichen R_F-Wert wie Actinomycin Z_3-II. Da im Totalhydrolysat auch die gleichen Aminosäuren, nämlich Threonin, Valin, Sarkosin, N-Methylvalin, N-Methylalanin, 5-Methylprolin und trans-4-Hydroxy-5-methylprolin gefunden wurden, ergibt sich für Actinomycin Z_{03} die Strukturformel 104. Actinomycin Z_{03} ist antibiotisch bis zur Verdünnung 1 : 125000 gegen Bac. subtilis wirksam.



104



Abbild. 14 IR-Spektrum von Actinomycin Z_{03} (in KBr)

V. Der Bauplan der Z-Actinomycine

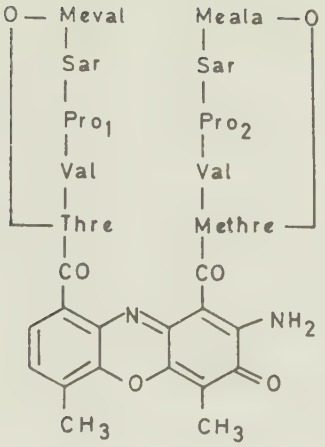
Aus den bei der Strukturermittlung der Z-Actinomycine erhaltenen Ergebnissen geht folgendes hervor:

1. Die Z-Actinomycine enthalten, wie alle anderen bisher bekannten Actinomycine, als Chromophor das Actinocin.
2. In allen strukturell aufgeklärten Z-Actinomycinen mit Ausnahme des Actinomycins Z_5 sind folgende Aminosäuren enthalten:

   1 Mol Threonin
   1 Mol N-Methylthreonin
   2 Mol Valin
   2 Mol Sarkosin
   1 Mol N-Methylvalin und
   1 Mol N-Methylalanin.
3. Alle Z-Actinomycine enthalten weiterhin 2 Mol eines verschieden hoch sauerstoffsubstituierten 5-Methylprolins.
4. Variationen treten, mit Ausnahme des Actinomycins Z_5, nur an den 5-Methylprolinbausteinen auf, die
   a) als 4-Oxo-5-methylprolin und 5-Methylprolin (Actinomycine Z_2, Z_3 und Z_4),
   b) als 4-Oxo-5-methylprolin und 3-Oxo-4-hydroxy-5-methylprolin bzw. 3-Hydroxy-4-oxo-5-methylprolin (Actinomycin Z_1),
   c) als 4-Hydroxy-5-methylprolin (trans) und 5-Methylprolin (Actinomycin Z_{03}) und
   d) wahrscheinlich als 4-Hydroxy-5-methylprolin (trans) und 3-Oxo-4-hydroxy-5-methylprolin bzw. 3-Hydroxy-4-oxo-5-methylprolin (Actinomycin Z_{01})

   vorliegen können.
5. Daß bei gleicher Sauerstoffsubstitution am 5-Methylprolinring der Z-Actinomycine mehrere Actinomycine (Z_2, Z_3, Z_4) entstehen können, beruht wahrscheinlich auf unterschiedlicher Konfiguration der 5-Methylprolinbausteine.

Damit ergibt sich für die Z-Actinomycine der in Abbildung 15 aufgestellte Bauplan.



Pro_1	Pro_2	Z-Actinomycin
5-Methylprolin	4-Oxo-5-methylprolin	Z_2, Z_3, Z_4,
5-Methylprolin	4-Hydroxy-5-methyl-prolin (trans)	Z_{O3}
3-Hydroxy-4-oxo-5-methylprolin	4-Oxo-5-methylprolin	Z_1
3-Hydroxy-4-oxo-5-methylprolin	4-Hydroxy-5-methyl-prolin (trans)	Z_{O1} (?)

Abbild. 15 Bauplan der Z-Actinomycine

Der Ersatz einer oder beider Prolinkomponenten gegen Sarkosin, wie er bei Actinomycin X-Bildnern[37] beobachtet wurde, ist bei den Z-Actinomycinen nicht gefunden worden. Fraglich ist es, ob unter den in sehr kleiner Menge vorhandenen Actinomycinen Z_{1a} und Z_{2a} oder unter den Z_0-Actinomycinen, für die noch keine quantitativen Aminosäurebestimmungen vorliegen, Verbindungen mit mehr als zwei Mol Sarkosin enthalten sind.

Die antibiotische Wirksamkeit der Z-Actinomycine nimmt mit steigender Lipophilie der jeweiligen Verbindungen zu. Während die mehrere Hydroxygruppen im Molekül tragenden Actinomycine Z_{01}, Z_{03} und Z_1 keine oder nur eine geringe Wirksamkeit haben, gehören die Actinomycine Z_3 und Z_4 zu den ausgesprochen hochwirksamen Actinomycinen (s. Tabelle 2).

Tabelle 2 : Antibiotische Wirksamkeit der Z-Actinomycine gegen Bac. subtilis

Substanz	wirks. Grenzkonzentration
1. Actinomycin C_3 (Standard)	1 : 12.8 Mill.
2. " Z_5	1 : 6.4 Mill.
3. " Z_4	1 : 12.8 Mill.
4. " Z_3	1 : 3.2 Mill.
5. " Z_2	1 : 1.6 Mill.
6. " Z_1	1 : 500000
7. " Z_{03}	1 : 125000
8. " Z_{02}	1 : 40000
9. " Z_{01}	keine Hemmzonen im Plattentest

VI. Darstellung der Vergleichsaminosäuren

1. 4-Hydroxy-5-methylprolin

Da die in den Z-Actinomycinen als Aminosäurebausteine enthaltenen Derivate des 5-Methylprolins bisher in der Literatur nicht beschrieben waren, mußte ein geeigneter Weg zur Darstellung dieser Verbindungen gefunden werden.

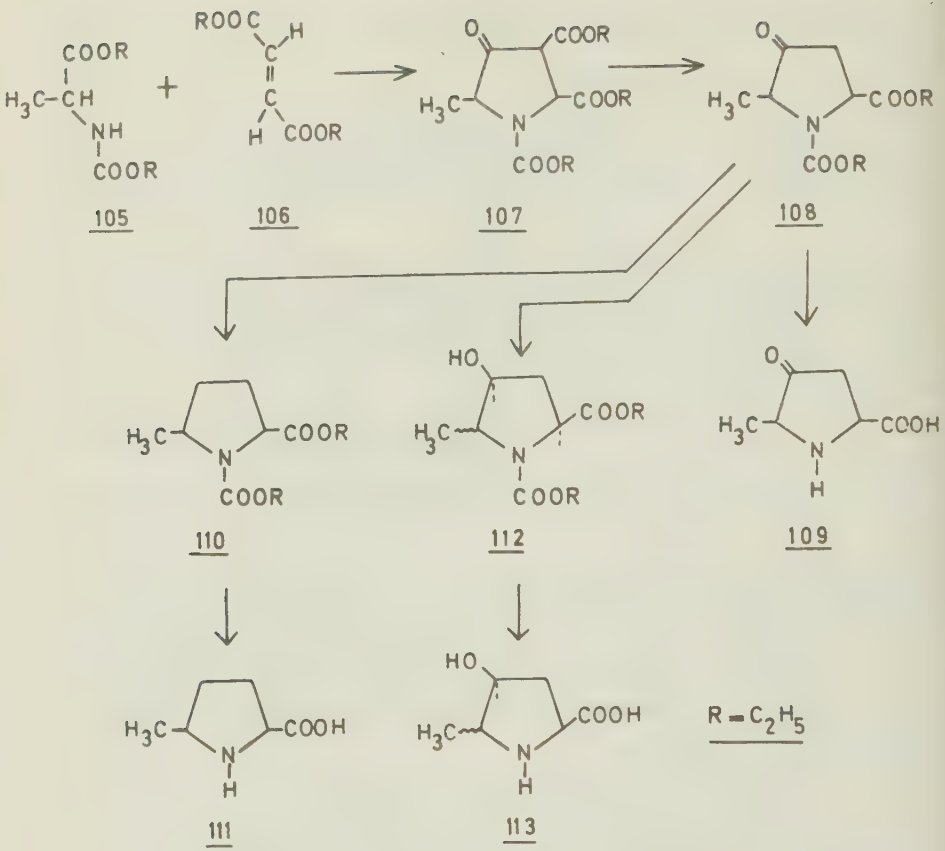
In meiner Diplomarbeit[22,25] hatte ich analog der 4-Oxoprolinsynthese von R. Kuhn und G. Osswald[38] ein Verfahren zur Synthese von 4-Oxo-5-methylprolin, 4-Hydroxy-5-methylprolin und 5-Methylprolin ausgearbeitet.

Durch Kondensation von N-Carbäthoxy-alaninäthylester (105) mit Fumarsäurediäthylester (106) wurde 1.2.3-Tricarbäthoxy-5-methyl-pyrrolidon-(4) (107) erhalten, das unter den Bedingungen einer Ketonspaltung in 1.2-Dicarbäthoxy-5-methyl-pyrrolidon-(4) (108) überführt wurde.

Von dieser Verbindung ausgehend wurde dann zunächst versucht, durch Hydrolyse mit konz. Jodwasserstoffsäure 4-Oxo-5-methylprolin (109) darzustellen. Diese Verbindung erwies sich jedoch an der Luft als unbeständig und zersetzte sich unter Bildung dunkelbrauner Schmieren.
Katalytische Reduktion von 108 mit Platindioxid in Eisessig führte zum 1.2-Dicarbäthoxy-5-methyl-pyrrolidin (110), aus dem durch Hydrolyse mit konz. Jodwasserstoffsäure 5-Methylprolin (111) erhalten wurde.

Reduktion von 108 mit Aluminiumisopropylat nach Meerwein-Ponndorf ergab 1.2-Dicarbäthoxy-5-methyl-pyrrolidol-(4) (112), ein zähes Öl, das nach Hydrolyse mit heiß gesättigtem Bariumhydroxid 4-Hydroxy-5-methylprolin (113) lieferte.

Das so erhaltene 4-Hydroxy-5-methylprolin erweist sich im Papierchromatogramm und im Pherogramm (pH 1.9; 2200 V/60 mA) als einheitlich. Nur wenn es in sehr starker Konzentration der Elektrophorese unterworfen wird, kann man nach Entwickeln des Pherogramms mit Isatin und Ehrlichs Reagens[36] neben der sehr



intensiv rotviolett gefärbten Hauptzone eine zweite, schwach rotviolette Zone entdecken, die etwa 1 % der eingesetzten Menge ausmacht. Diese zweite Zone hat eine deutlich geringere Wanderungsgeschwindigkeit, die dem im Actinomycin Z_1-I gefundenen 4-Hydroxy-5-methylprolin entspricht, während die Wanderungsgeschwindigkeit der Hauptzone dem in Actinomycin Z_1-II gefundenen 4-Hydroxy-5-methylprolin entspricht.

Ich kam daher auf die Vermutung, daß die Meerwein-Ponndorf-Reduktion von 1.2-Dicarbäthoxy-5-methylpyrrolidon-(4) (108) sterisch fast einheitlich verläuft und zum Pyrrolidol mit zur

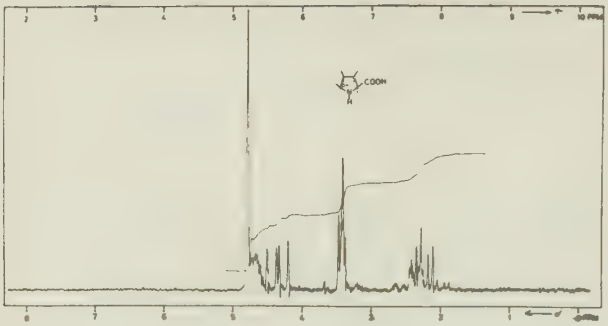
Carboxygruppe cis-ständiger Hydroxygruppe (112) führt. Aus diesem entsteht nach Hydrolyse das dem allo-4-Hydroxyprolin entsprechende 4-Hydroxy-5-methylprolin 113. In sehr geringer Menge ist bei der Reduktion auch das entsprechende trans-Produkt 114 entstanden.

Einen Beweis dafür liefert das Pherogramm. Der Unterschied der Wanderungsgeschwindigkeiten zwischen dem in großer Menge entstandenen 4-Hydroxy-5-methylprolin 113 und der entsprechenden in sehr kleiner Ausbeute entstandenen Verbindung 114 war ebenso groß wie der Unterschied zwischen allo-4-Hydroxyprolin und 4-Hydroxyprolin (Abbild. 2).

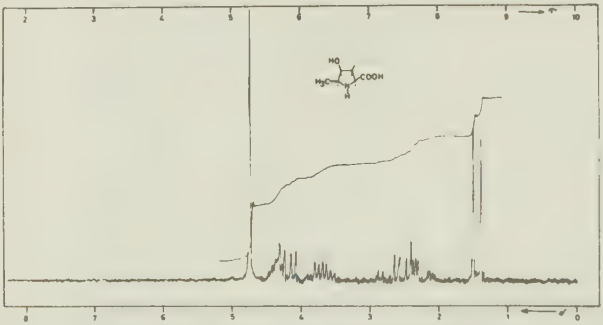
Einen zweiten Beweis erhält man durch das NMR-Spektrum. Die sehr komplexen Spektren von 4-Hydroxyprolin (Abbild. 16) und allo-4-Hydroxyprolin (Abbild. 18) waren von R. J. Abraham und K. A. Mc. Lauchlan[39] analysiert worden. Vergleicht man nun das NMR-Spektrum des erhaltenen 4-Hydroxy-5-methylprolins 113 mit den NMR-Spektren von allo-4-Hydroxyprolin und 4-Hydroxyprolin (Abbildungen 16, 17, 18), so kann man feststellen, daß die δ-Werte für die Protonen an C_2 und C_3, in denen sich im 5-Methylprolinderivat gegenüber der methylfreien Verbindung die Umgebung am wenigsten geändert hat, mit denen von allo-4-Hydroxyprolin und nicht mit denen von 4-Hydroxyprolin übereinstimmen. Ebenso ist die sehr komplizierte Aufspaltung der C_2 und C_3 Protonen (es treten Kopplungen über vier Bindungen auf) vollkommen identisch bei 4-Hydroxy-5-methylprolin und allo-4-Hydroxyprolin.

Damit ist eindeutig bewiesen, daß bei der Meerwein-Ponndorf-Reduktion von 108 ausschließlich die Verbindung 112 mit zur Carboxygruppe cis-ständiger Hydroxygruppe entsteht und daß das nach Hydrolyse erhaltene 4-Hydroxy-5-methylprolin 113 in der relativen Konfiguration des allo-4-Hydroxyprolins vorliegt.

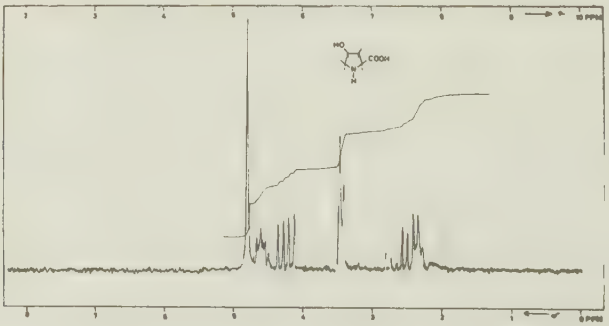
Die Darstellung der Verbindung mit trans-Konfiguration (114) konnte einmal durch Entwickeln einer völlig neuen Synthese vorgenommen werden. Zum anderen konnte man aber auch versuchen, die Konfiguration am C_4 des 4-Hydroxy-5-methylprolins 113 umzukehren.



Abbild. 16 NMR-Spektrum von D.L-4-Hydroxyprolin (in D_2O)



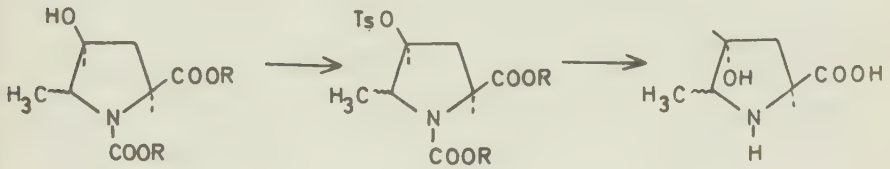
Abbild. 17 NMR-Spektrum von 4-Hydroxy-5-methylprolin (in D_2O)



Abbild. 18 NMR-Spektrum von allo-4-Hydroxyprolin (in D_2O)

Ich habe diesen zweiten Weg auf Grund folgender Überlegung eingeschlagen: Es war bekannt, daß allo-4-Hydroxyprolin nach N-Acetylierung, Überführung in den Methylester und Tosylierung der Hydroxygruppe bei alkalischer Hydrolyse unter Konfigurationsumkehr am C_4 4-Hydroxyprolin liefert[40].

Als Ausgangsverbindung für eine analoge Umsetzung wählte ich 1.2-Dicarbäthoxy-5-methyl-pyrrolidol-(4) (108). Diese Verbindung wurde in Pyridin mit p-Toluolsulfochlorid umgesetzt und lieferte das 1.2-Dicarbäthoxy-5-methylpyrrolidol-(4)-tosylat (115), ein schwach gelb gefärbtes, sehr zähflüssiges Öl.



112 115 114

Hydrolysiert man diese Verbindung mit heiß gesättigtem Bariumhydroxid und untersucht das entstandene 4-Hydroxy-5-methylprolin pherographisch, so stellt man fest, daß es zu etwa gleichen Teilen aus den Verbindungen 114 und 113 besteht.

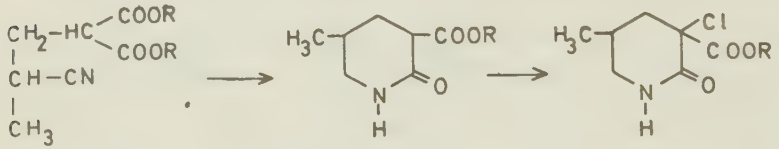
Eine Trennung des Gemisches über die Kupfersalze, wie sie beim allo-4-Hydroxyprolin und 4-Hydroxyprolin möglich ist, ist mir beim 4-Hydroxy-5-methylprolin nicht gelungen. Aus Wasser kristallisierte stets ein Gemisch beider Kupfersalze aus.

Da die Analysen des erhaltenen 4-Hydroxy-5-methylprolingemisches jedoch mit denen von reinem 113 übereinstimmen und da das NMR-Spektrum sehr viel komplexer geworden ist, kann man mit Sicherheit annehmen, daß das neu entstandene 4-Hydroxy-5-methylprolin die dem 4-Hydroxyprolin entsprechende Konfiguration 114 besitzt.

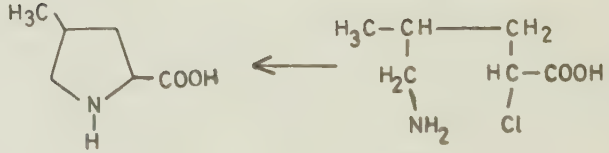
2. 3-Methylprolin; 4-Methylprolin

Um sicher zu sein, daß das in den Actinomycinen Z_{03}, Z_2, Z_3, Z_4 und Z_5 gefundene Methylprolin ein 5-Methylprolin und nicht etwa ein 3- oder 4-Methylprolin ist, die ja beide den gleichen R_F-Wert wie 5-Methylprolin im Chromatogramm und Pherogramm haben könnten, mußten 3- und 4-Methylprolin synthetisiert werden.

Da die bisher bekannten Synthesen dieser beiden Proline mir sehr umständlich erschienen, habe ich eine Prolinsynthese von N. F. Albertson und J. L. Fillman[41] auf 3- und 4-Methylprolin umgearbeitet und beide Verbindungen in Ausbeuten von 35 % (3-Methylprolin) und 39.5 % (4-Methylprolin) erhalten.



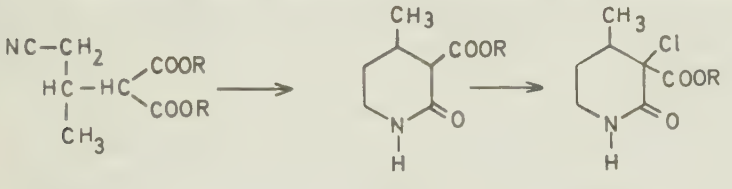
116 117 118



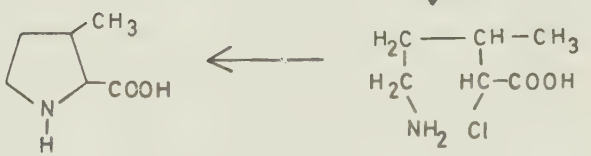
120 119

2-Cyanpropyl-malonester-(1) (116), dargestellt durch Michael-Addition von Methacrylsäurenitril an Malonester, wird mit Raney-Nickel in Äthanol bei 80° und 70 atm. hydriert. Das zunächst entstehende Amin reagiert mit einer Estergruppe unter Bildung von 3-Carbäthoxy-5-methylpiperidon-(2) (117). Der acide Wasserstoff an C_3 von 117 wird dann mit Sulfurylchlorid gegen Chlor

ausgetauscht (118). Hydrolyse dieses Lactams mit konz. Salzsäure führt unter gleichzeitiger Verseifung und Decarboxylierung zur 2-Chlor-4-methyl-5-amino-valeriansäure (119), die mit konz. wäßr. Natriumhydroxid zum 4-Methylprolin (120) cyclisiert wird.



121 122 123



125 124

Auf die gleiche Weise wird durch Druckhydrierung von 1-Cyan-propyl-malonester-(2) (121) 3-Carbäthoxy-4-methyl-piperidon-(2) (122) dargestellt, das nach Chlorierung mit Sulfurylchlorid (123) sauer zum 2-Chlor-3-methyl-5-aminovaleriansäure-hydrochlorid (124) umgesetzt wird. Cyclisierung mit konz. wäßr. Natirumhydroxid führt zum 3-Methylprolin (125).

Vergleicht man die R_F-Werte von 3-, 4- und 5-Methylprolin im Hochspannungspherogramm und im Papierchromatogramm in verschiedenen Systemen, so erhält man folgende Ergebnisse:

1. Hochspannungspherogramm (pH 1.9; 2200 V/60-65 mA; Laufzeit: 90 Min.)
   Abstufung der Wanderungsgeschwindigkeit:
   3-Methylprolin > 5-Methylprolin > 4-Methylprolin
   Die Unterschiede zwischen 3- und 5-Methylprolin sind sehr gering

2. Ring-Papierchromatogramm (System: Butanol - Eisessig - Wasser 4 : 1 : 7)
   Abstufung der R_F-Werte:
   4-Methylprolin > 3-Methylprolin = 5-Methylprolin
   3- und 5-Methylprolin trennen sich in diesem System nicht.
3. Absteigendes Papierchromatogramm (System: Butanol - Phenol - Eisessig - Citratpuffer pH 6.4 20 : 16 : 1 : 20)
   Abstufung der R_F-Werte:
   4-Methylprolin > 5-Methylprolin > 3-Methylprolin

Man kann also 5-Methylprolin pherographisch und chromatographisch von 4- und 3-Methylprolin unterscheiden. Damit sind die in den Z-Actinomycinen gefundenen Methylproline eindeutig zuzuordnen.

VII. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Verlaufe dieser Arbeit gelang es, die noch fehlenden drei Aminosäurebausteine des Actinomycins Z_1 zu identifizieren und damit die Struktur des in größter Menge in Actinomycin Z-Gemischen vorhandenen Actinomycins Z_1 aufzuklären. Folgende Befunde wurden dabei berücksichtigt:

1. Die Meerwein-Ponndorf-Reduktionsprodukte des Actinomycins Z_1 (Actinomycin Z_1-I und Actinomycin Z_1-II) enthalten je ein Mol 4-Hydroxy-5-methylprolin entweder in der dem allo-4-Hydroxyprolin entsprechenden cis-Form (Actinomycin Z_1-II) oder in der dem 4-Hydroxyprolin entsprechenden trans-Form (Actinomycin Z_1-I). Da nach Hydrolyse von Actinomycin Z_1-I und Actinomycin Z_1-II mit Jodwasserstoffsäure und rotem Phosphor 5-Methylprolin chromatographisch nachgewiesen werden kann und da ebenfalls im Actinomycin Z_1 nach katalytischer Reduktion mit Platindioxid in Eisessig und anschließende Hydrolyse 5-Methylprolin gefunden wird, muß im Actinomycin Z_1 als achter Aminosäurebaustein 4-Oxo-5-methylprolin vorkommen.

2. In quantitativen Aminosäurebestimmungen von Actinomycin Z_1-I und Actinomycin Z_1-II werden nach reduzierender Hydrolyse mit Jodwasserstoffsäure zwei Mol 5-Methylprolin gefunden. Demnach muß ein zweiter unbekannter Baustein des Actinomycins Z_1 ebenfalls ein 5-Methylprolingerüst enthalten.

   Da außer Oxoprolinen keine der salzsauren Hydrolyse gegenüber unbeständigen Prolinderivate ohne oder mit nur einer Sauerstoffgruppe bekannt sind und da Oxoproline nach Reduktion leicht als Hydroxyproline nachgewiesen werden können, muß der zweite 5-Methylprolinrest im Actinomycin Z_1 mindestens zwei sauerstoffhaltige Gruppen tragen, die auch nach Reduktion die Unbeständigkeit dieser Verbindung unter Hydrolysebedingungen bewirken.

   Wie aus Acetylierungsversuchen hervorgeht, läßt sich Actinomycin Z_1 je nach Acetylierungsdauer in ein Mono- oder ein

Diacetat überführen. Redoxtitrationen zeigen, daß im Gegensatz zum Actinomycin Z_1 das Diacetat eine zweite reduzierbare Gruppe enthält. Nach Meerwein-Ponndorf-Reduktion kann man keine selektive Acetylierung mehr beobachten. Es entsteht ausschließlich ein Triacetat. Daraus kann man schließen, daß in der zweiten prolinanalogen Komponente des Actinomycins Z_1 ein Hydroxy-oxo-system vorliegt, das nach Reduktion in ein 1.2-Diolsystem übergeht.

Zur Festlegung der Stellung der Sauerstoffatome wurde Actinomycin Z_1 mit wäßr. Perjodsäure behandelt. Dabei läßt sich im Gegensatz zu anderen bekannten Actinomycinen eine Actinomycinsäure isolieren, in der noch beide Lactonringe erhalten sind. Im Hydrolysat dieser Actinomycinsäure kann man Alanin und Glycin nachweisen.

Damit ist der neunte Aminosäurebaustein des Actinomycins Z_1 3-Hydroxy-4-oxo-5-methylprolin (bzw. 3-Oxo-4-hydroxy-5-methylprolin), eine bisher in der Natur nicht gefundene Aminosäure.

3. Der letzte noch fehlende Aminosäurebaustein des Actinomycins Z_1 wurde durch milde alkalische Lactonspaltung in Gegenwart von Raney-Nickel nachgewiesen. Dabei geht dieser Baustein im Peptidverband zum großen Teil in Sarkosin und zum geringen Teil in N-Methylaminobuttersäure über. Eine solche Verbindung kann nur N-Methylthreonin sein. Diese Befunde stimmen mit den am Modell gemachten Erfahrungen sowie mit den N-Methylbestimmungen überein. N-Methylthreonin ist bis jetzt in der Natur ebenfalls noch nicht gefunden worden.

Nach den so erhaltenen Ergebnissen wurde eine dem Bauplan der Actinomycine analoge Strukturformel aufgestellt (87), deren Sequenz zum Teil durch Abbauversuche mit konz. Salzsäure bestätigt wurde. Ebenso wurden erste Anhaltspunkte für die Verteilung der ungleichen Aminosäurepaare auf die beiden Peptidlactonringe erhalten.

Actinomycin Z_S-Gemisch, von der Hauptmenge an Actinomycin Z_1 sowie von der Actinomycin Z_0-Fraktion befreit, konnte durch

präparative Papierchromatographie in sieben Verbindungen aufgetrennt werden, von denen die Actinomycine Z_2, Z_3, Z_4 und Z_5 erstmals rein und kristallisiert erhalten wurden.

Die Struktur von Actinomycin Z_5 (99) wurde aufgeklärt. Im Peptidverband fand ich 2 Mol Threonin, 2 Mol Valin, 1 Mol 5-Methylprolin, 2 Mol Sarkosin, 1 Mol N-Methylvalin und 1 Mol N-Methylalanin. 1 Mol 4-Oxo-5-methylprolin wurde nach Reduktion von Actinomycin Z_5 als 4-Hydroxy-5-methylprolin nachgewiesen.

Die Actinomycine Z_2, Z_3 und Z_4 sind strukturell sehr nahe verwandt. Ich fand im Hydrolysat jeweils die gleichen Aminosäuren, nämlich 1 Mol Threonin, 2 Mol Valin, 1 Mol N-Methylthreonin, 1 Mol 5-Methylprolin, 2 Mol Sarkosin, 1 Mol N-Methylvalin und 1 Mol N-Methylalanin. Nach Meerwein-Ponndorf-Reduktion konnte je 1 Mol 4-Oxo-5-methylprolin als 4-Hydroxy-5-methylprolin nachgewiesen werden.

Außer in den R_F-Werten und den antibiotischen Wirksamkeiten unterscheiden sich Actinomycin Z_4 und Actinomycin Z_3 nicht; Actinomycin Z_2 läßt sich im Gegensatz zu den Actinomycinen Z_3 und Z_4 acetylieren.

Weiterhin wurden erste Trennungsversuche von Actinomycin Z_0-Gemisch durchgeführt. Durch Verteilungschromatographie an Cellulosepulversäulen konnten die Actinomycine Z_{01} und Z_{03} einheitlich erhalten werden.

Im Totalhydrolysat von Actinomycin Z_{01} fand ich qualitativ Threonin, Valin, Sarkosin, N-Methylvalin, N-Methylalanin und 4-Hydroxy-5-methylprolin in der trans-Form.

Actinomycin Z_{03} entspricht im R_F-Wert dem Actinomycin Z_3-II und enthält die gleichen Aminosäurebausteine wie dieses. Es hat damit wahrscheinlich die Strukturformel 104.

Auf Grund der bei der Untersuchung der Z-Actinomycine erhaltenen Ergebnisse wurde ein Bauplan der Z-Actinomycine aufgestellt, der zeigte, daß Variationen innerhalb der Reihe der Z-Actinomycine vorwiegend an den 5-Methylprolinbausteinen auftreten, die durch

4-Oxo-5-methylprolin, 4-Hydroxy-5-methylprolin und 3-Hydroxy-4-oxo-5-methylprolin (bzw. 3-Oxo-4-hydroxy-5-methylprolin) ersetzt werden können.

Zur Identifizierung der im Actinomycin Z_1 gefundenen Aminosäuren mußten Vergleichsverbindungen dargestellt werden. Das noch unbekannte trans-4-Hydroxy-5-methylprolin wurde durch Tosylierung von 1.2-Dicarbäthoxy-5-methylpyrrolidol-(4) und anschließende alkalische Verseifung dargestellt.

3- und 4-Methylprolin, die für chromatographische und pherographische Vergleiche benötigt wurden, konnten in 35 proz. bzw. 39.5 proz. Ausbeute analog einer von N. F. Albertson und J. L. Fillman publizierten Prolinsynthese dargestellt werden.

Beschreibung der Versuche

I. Allgemeines

Das stets verwendete Aluminiumoxid IV (stand. nach H. Brockmann) wurde aus Präparaten der Fa. Merck durch Schütteln mit 9 % Wasser und aus Präparaten der Fa. Woelm durch Schütteln mit 10 % Wasser hergestellt.

Das verwendete Cellulosepulver Nr. 123 und das Chromatographiepapier Nr. 2043 b, mgl. ausg. stammten von der Fa. Schleicher & Schüll, das für die Elektrophorese benutzte Papier Nr. 214 von der Fa. Macherey & Nagel.

Alle Kresotinatlösungen wurden aus einer 10 proz. wäßr. Lösung von Natrium-m-kresotinat, mit m-Kresotinsäure gesättigt, durch entsprechendes Verdünnen mit Wasser hergestellt.

Die chromatographisch getrennten Aminosäuren wurden mit folgenden Reagentien entwickelt:

a) Ninhydrin: 0.2 proz. Lösung in Butanol - Eisessig (24:1).

b) Isatin: 0.3 proz. Lösung in Butanol - Eisessig (24:1).

c) Ehrlichs Reagens (nach Vorbehandlung mit Isatin für Hydroxyproline): 1 proz. Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd in Aceton - konz. Salzsäure (9:1).

d) Reagens nach Waser-Edlbacher (für N-Methylaminosäuren): Besprühen mit Pyridin und einer benzolischen Lösung von p-Nitrobenzoylchlorid.

Die Elementaranalysen und alle physikalischen Messungen bei Actinomycinen und Actinomycinderivaten wurden mit pulverisierten, bei 110° i. Hochvak. getrockneten Präparaten durchgeführt.

Die quantitativen Aminosäurebestimmungen wurden nach dem von H. Brockmann und J. H. Manegold entwickelten Verfahren durchgeführt.

II. Die Meerwein-Ponndorf-Reduktionsprodukte von Actinomycin Z_1

1. Actinomycin Z_1-I; Actinomycin Z_1-II

Eine Mischung aus 500 mg Actinomycin Z_1, 7.5 g Aluminiumisopropylat, 50 ccm Benzol und 150 ccm abs. Isopropanol hielt man unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit 12 Stdn. am Sieden und gab zu der erkalteten, zunächst grünen, dann schmutzig roten Lösung nacheinander 500 ccm Chloroform und 60 ccm 2n H_2SO_4 (Farbumschlag nach Rot). Nach Abtrennen der Chloroformschicht schüttelte man die wäßr. Phase noch einmal mit wenig Chloroform aus und dampfte die vereinigten, getrockneten Chloroformauszüge i. Vak. zur Trockne ein.

Der Rückstand, ein rotes, amorphes Pulver, ließ sich im Papierchromatogramm im System Butylacetat - Butanol - Dibutyläther - 5 proz. Kresotinatlösung (6:1:1:8) in zwei sehr dicht nebeneinander liegende Zonen annähernd gleicher Stärke (Z_1-I, Z_1-II; nach steigendem R_F-Wert durch römische Ziffern gekennzeichnet) sowie einer mit der Front wandernden schwachen, actinomycingelben Zone (Z_1-III, Z_1-IV, Z_1-V; nach steigendem R_F-Wert im System Butylacetat - 10 proz. wäßr. Kresotinat 1:1) auftrennen. Zur Abtrennung dieser Nebenprodukte wurde das Reduktionsprodukt in Chloroform/Benzol (1:5) gelöst, an einer mit Benzol eingeschlämmten Säule aus Aluminiumoxid IV (10×3 cm) adsorbiert, die Actinomycine Z_1-III, Z_1-IV und Z_1-V mit Aceton eluiert und anschließend die Hauptmenge (Actinomycine Z_1-I/Z_1-II) mit Methanol von der Säule gewaschen.

Das Methanoleluat wurde eingedampft, der Rückstand (410 mg) in der Oberphase des Systems Butylacetat - Butanol - Dibutyläther - 5 proz. Kresotinatlösung (6:1:1:8) gelöst und die Lösung auf eine Cellulosepulversäule (60×8 cm), die mit der unteren Phase des gleichen Lösungsmittelsystems eingeschlämmt war, gegeben. Beim Nachwaschen mit Oberphase entwickelten sich zwei sehr dicht nebeneinander liegende Zonen (enthaltend Z_1-I und Z_1-II). Sie wurden ausgeschnitten, ihre Inhaltsstoffe mit Methanol eluiert, die Eluate eingeengt, die Rückstände in Chloroform gelöst und mit

5 proz. wäßr. Natriumhydrogencarbonat ausgeschüttelt. Die Chloroformphasen wurden mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft.

a) Actinomycin Z_1-I

Ausbeute: 190 mg; feine Nadeln aus Benzol/Cyclohexan

Schmp. 250° (korr., Berl-Block; Zers.)

Spez. Extinktion bei 442 mμ: α = 18.90 (Methanol)

Ber. Mol.-Gew. (mit ε = 25000 ± 400): 1320 ± 25

$C_{63}H_{88}N_{12}O_{19}$ (1317.5) Ber. C 57.44 H 6.73 N 12.76
Gef. C 57.14 H 6.75 N 12.40

Aminosäurebest. (Mol/Mol Actinomycin)

Thr 0.65	Val 1.85	Hydr.meth.pro 0.85
Sar 1.80	Meval 1.00	Meala 0.90

Im Plattentest gegen B. subtilis unwirksam.

b) Actinomycin Z_1-II

Ausbeute: 178 mg; feine Nadeln aus Benzol/Cyclohexan

Schmp. 249° (korr., Berl-Block; Zers.)

Spez. Extinktion bei 442 mμ: α = 18.95 (Methanol)

Ber. Mol.-Gew. (mit ε = 25000 ± 400): 1320 ± 25

$C_{63}H_{88}N_{12}O_{19}$ (1317.5) Ber. C 57.44 H 6.73 N 12.76
Gef. C 56.90 H 6.70 N 12.43

Aminosäurebest. (Mol/Mol Actinomycin)

Thr 0.70	Val 1.80	Hydr.meth.pro 0.80
Sar 1.95	Meval 1.00	Meala 0.95

Im Plattentest gegen B. subtilis unwirksam.

2. Die Actinomycine Z_1-III, Z_1-IV und Z_1-V

Die nach der Reduktion von Actinomycin Z_1 durch Adsorption an Aluminiumoxid IV und Eluieren mit Aceton erhaltene Fraktion (insgesamt 14 mg aus 500 mg Actinomycin Z_1) wurde ringchromatographisch auf zwei Bogen Schleicher & Schüll 2043 b, mgl. ausgew. im System Butylacetat - 10 proz. Kresotinatlösung (1:1) getrennt. Die drei entstandenen Zonen (Z_1-III, Z_1-IV und Z_1-V; nach steigendem R_F-Wert durch römische Ziffern gekennzeichnet) wurden ausgeschnitten, ihre Inhaltsstoffe mit Methanol eluiert und durch Verteilen zwischen wäßr. Natriumhydrogencarbonat und Chloroform von Kresotinsäure befreit. Die nach Abdampfen des Chloroforms zurückbleibenden Actinomycine wurden aus Chloroform/Ligroin

umgefällt, mit 6n HCl 48 Stdn. bei 110° hydrolysiert und pherographisch (pH 1.9; Ameisensäure-Essigsäure-Puffer) und papierchromatographisch (in den Systemen Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:7 und Butanol-Phenol-Eisessig-Citratpuffer pH 6.4 20:16:1:20) auf Aminosäuren geprüft.

Z_1-III: Alle Aminos. von Act. Z_1; zusätzlich 4-Hydroxy-5-methylprolin

Z_1-IV : " " " " Z_1; zusätzlich Prolin

Z_1-V : " " " " Z_1; zusätzlich 5-Methylprolin

3. Actinomycin Z_1-I-triacetat; Actinomycin Z_1-II-triacetat

450 mg Actinomycin Z_1-I/II-Gemisch wurden mit 30 ccm Acetanhydrid/Pyridin (2:1) versetzt und 24 Stdn. bei Raumtemperatur gehalten. Das Lösungsmittel wurde anschließend i. Hochvak. abgedampft. Der Rückstand zeigte im Ringchromatogramm im System Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. Kresotinatlösung (3:1:4) und im System Butylacetat - 10 proz. Kresotinatlösung (1:1) zwei annähernd gleichstarke Zonen mit R_F-Werten zwischen Actinomycin Z_1 und Actinomycin Z_1-monoacetat.

Die Acetylierungsprodukte wurden im System Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. Kresotinatlösung (3:1:4) an einer Cellulosepulversäule (30 x 2 cm) in zwei Zonen aufgetrennt. Das Methanoleluat der oberen Zone (Z_1-I-triacetat) sowie das der unteren Zone (Z_1-II-triacetat) wurde etwas eingeengt, viel Chloroform zugegeben, mit wäßr. Natriumhydrogencarbonat und Wasser geschüttelt, um die Kresotinsäure zu entfernen, und zur Trockne eingedampft. Die Rückstände löste man in Benzol und adsorbierte an je einer mit Benzol eingeschlämmten Säule aus Aluminiumoxid IV (20 x 2 cm). Mit Äthylacetat konnte die Hauptmenge ins Filtrat gewaschen werden. Am oberen Rand der Säule blieben geringe Mengen brauner Verunreinigungen zurück.

a) Actinomycin Z_1-I-triacetat

Ausbeute: 228 mg; kleine Prismen aus Benzol/Ligroin
Schmp. 252° (korr., Berl-Block; Zers.)
Spez. Extinktion bei 442 mμ: α = 18.05 (Methanol)

Ber. Mol.-Gew. (mit $\varepsilon = 25000 \pm 400$): 1385 ± 25

$[\alpha]_{578}^{20}$: $-27 \pm 3^{\circ}$ (c = 0.2; in Methanol)

IR-Spektrum: Die Bande bei 8.15μ besitzt die dreifache Maximalintensität wie die von Actinomycin Z_1-monoacetat.

$C_{69}H_{90}N_{12}O_{23}$ (1439.6) Ber. C 57.57 H 6.30 N 11.68 O 24.45
Gef. C 57.10 H 6.40 N 11.58 O 24.30

Ber. O-Acetyl 9.0
Gef. O-Acetyl 9.0 *)

*) Nach Abzug von 0.7 % Blindwert. Verseift mit methanol. NaOH.

Aminosäurebest. (Mol/Mol Actinomycin)

Thr 0.70	Val 1.80	Hydr.meth.pro 0.90
Sar 1.95	Meval 0.90	Meala 0.80

Im Plattentest gegen B. subtilis unwirksam.

b) Actinomycin Z_1-II-triacetat

Ausbeute: 176 mg; krist. aus Benzol/Ligroin

Schmp. 253° (korr., Berl-Block; Zers.)

Spez. Extinktion bei 441 mμ: α = 18.01 (Methanol)

Ber. Mol.-Gew. (mit $\varepsilon = 25000 \pm 400$): 1388 ± 25

$[\alpha]_{578}^{20}$: $-41 \pm 3^{\circ}$ (c = 0.2; in Methanol)

IR-Spektrum: Die Bande bei 8.15μ besitzt die dreifache Maximalintensität wie die von Actinomycin Z_1-monoacetat.

$C_{69}H_{90}N_{12}O_{23}$ (1439.6) Ber. C 57.57 H 6.30 N 11.68 O 24.45
Gef. C 57.15 H 6.70 N 11.38 O 24.85

Ber. O-Acetyl 9.0
Gef. O-Acetyl 9.4 *)

*) Nach Abzug von 0.7 % Blindwert. Verseift mit methanol. NaOH.

Aminosäurebest. (Mol/Mol Actinomycin)

Thr 0.75	Val 1.90	Hydr.meth.pro 0.90
Sar 1.80	Meval 1.00	Meala 0.85

Im Plattentest gegen B. subtilis unwirksam.

III. Actinomycin Z_1-Säuren

1. Actinomycinsäure Z_1-S_1

500 mg Actinomycin Z_1, gelöst in 20 ccm Methanol, schüttelte man nach Zugabe von 400 mg Palladium-Kohle (10 proz.) unter Wasserstoff, bis eine hellgelbgrüne Lösung entstanden war. Die Lösung wurde durch eine G4-Fritte unter Wasserstoff bei Eiskühlung in eine Mischung aus 100 ccm 5n Natriummethylat und 1 ccm Wasser gesaugt. Die erhaltene tiefbraune Lösung ließ man 5 Stdn. bei Raumtemperatur stehen und versetzte unter Wasserstoff im Eisbad langsam mit 105 ccm 5n HCl. Der durch ausgefallenes Natriumchlorid entstandene hellgelbe Brei wurde auf 500 ccm Wasser gegeben und zur Reoxydation des Chromophors einige Zeit Luft durch die klare Lösung gesaugt. Danach wurde erschöpfend mit Chloroform extrahiert, die Chloroformphase mit Wasser gewaschen, getrocknet und i. Vak. eingedampft. Das erhaltene Rohprodukt fällte man nach Vorlösen in wenig Methanol aus Chloroform/Petroläther zweimal um.

Ausbeute: 390 mg; amorphes, gelb-rotes Pulver
Schmp. 191° (korr., Berl-Block; Zers.)
Spez. Extinktion bei 443 mμ: α = 17.75 (Methanol)
$[\alpha]_D^{20}$: $-68 \pm 3°$ (c = 0.2; in Methanol)

Gef. C 55.08 H 6.55 N 11.91 O 24.67

Aminosäurebest. (Mol/Mol Actinomycinsäure)

Thr	0.73	Val	1.80	Sar	1.56
Meval	0.91	Meala	0.80		

Abbau mit konz. Salzsäure: 25 mg Actinomycinsäure Z_1-S_1 werden unter den Bedingungen der Bis-seco-Spaltung (s. Abschnitt V) 25 Min. mit 5 ccm konz. Salzsäure auf 80° erhitzt. Nach Abdampfen der Salzsäure adsorbierte man den rotbraunen Rückstand aus Wasser an einer mit Wasser eingeschlämmten Säule aus saurem Aluminiumoxid (5 x 1 cm) und wusch mit 40 ccm Wasser nach. Das erhaltene schwach gelb gefärbte Eluat wurde eingedampft, in 1 ccm Wasser gelöst und pherographisch (pH 1.9; Ameisensäure-Essigsäure-Puffer) und chromatographisch (Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:7) auf Aminosäuren und Peptide geprüft.

Gef. Aminosäuren: N-Methylvalin und N-Methylalanin in annähernd gleicher Menge; daneben wenig Sarkosin.

Gef. Peptide: keine.

2. Actinomycinsäuren Z_1-S_4 bis Z_1-S_7

200 mg Actinomycin Z_1 wurden in 200 ccm Isopropanol/Wasser (1:1) gelöst, mit einer Spatelspitze Raney-Nickel versetzt und bei 40° bis zur Leukostufe hydriert. Dann gab man unter Wasserstoff 2.5 ccm n NaOH zu (Farbumschlag nach Braunrot) und hielt die Lösung unter Rühren weiter auf 40°.

Nach 4 Tagen war die Wasserstoffaufnahme fast beendet. Es wurde mit 1.25 ccm 2n HCl neutralisiert (Farbumschlag nach Gelb) und vom Katalysator abfiltriert. Die Reoxydation des Chromophors an der Luft war nach 4 Stdn. beendet. Die Lösung wurde i. Vak. zur Trockne eingedampft.

Das erhaltene Rohprodukt löste man in 2 proz. wäßr. Natriumhydrogencarbonat und entfernte einen fluoreszierenden Stoff durch mehrmaliges Ausschütteln mit Chloroform. Dann wurde die Lösung mit verd. Salzsäure angesäuert, die Actinomycinsäuren mit Chloroform extrahiert und das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert.

Der Rückstand zeigte im Papierchromatogramm im System Butanol - Butylacetat - 3 proz. Kresotinatlösung (7:3:10) vier sehr dicht nebeneinander liegende, scharf voneinander abgegrenzte Zonen annähernd gleicher Stärke, sowie drei sehr schwache Vorzonen. Zur Trennung wurde die Gesamtmenge an einer Cellulosepulversäule (44 x 3 cm) im gleichen System chromatographiert.

Nach 10 Tagen hatten sich am oberen Teil der Säule vier scharf voneinander abgegrenzte Zonen entwickelt (Z_1-S_4, Z_1-S_5, Z_1-S_6 und Z_1-S_7; nach steigendem R_F-Wert durch arabische Ziffern gekennzeichnet). Drei Zonen mit größeren R_F-Werten (Z_1-S_{8-10}) waren eluiert worden. Die Zonen wurden ausgeschnitten, ihre Inhaltsstoffe mit Methanol eluiert und die Eluate i. Vak. eingedampft. Die Rückstände wurden in je 50 ccm Wasser gelöst, mit verd. Salzsäure angesäuert und mit Chloroform erschöpfend extrahiert. Dabei gingen die Actinomycinsäuren und die Kresotinsäure

in die organische Phase. Um die Kresotinsäure abzutrennen, gab man die i. Vak. auf 10 ccm eingeengten Chloroformlösungen auf je eine mit Chloroform eingeschlämmte Säule aus 10 g neutralem Kieselgel und wusch mit Chloroform nach, bis die Eluate mit wäßr. Eisen(III)-chlorid keine Färbungen mehr gaben. Dann wurden die Actinomycinsäuren mit Methanol von der Säule gewaschen, durch eine G4-Fritte filtriert und eingedampft. Die erhaltenen Actinomycinsäuren wurden zweimal aus Chloroform/Petroläther umgefällt.

a) Actinomycinsäure Z_1-S_4

Ausbeute: 80 mg; amorphes, gelbes Pulver

Schmp. 180° (korr., Berl-Block; Zers.)

Spez. Extinktion bei 442 mμ: α = 16.7 (Methanol)

Aminosäurebest. (Mol/Mol Actinomycinsäure)

Thr 0.25	Ambu 0.50	Val 1.90
Sar 2.05	Meval 1.00	Meala 0.95

b) Actinomycinsäure Z_1-S_5

Ausbeute: 17 mg; amorphes, gelbes Pulver

Schmp. 182° (korr., Berl-Block; Zers.)

Spez. Extinktion bei 442 mμ: α = 17.4 (Methanol)

Aminosäurebest. (Mol/Mol Actinomycinsäure)

Thr Sp.	Ambu 0.55	Val 2.00
Sar 2.40	Meval 1.00	Meala 0.90

c) Actinomycinsäure Z_1-S_6

Ausbeute: 31 mg; amorphes, gelbes Pulver

Schmp. 195° (korr., Berl-Block; Zers.)

Spez. Extinktion bei 441 mμ: α = 18.95 (Methanol)

Aminosäurebest. (Mol/Mol Actinomycinsäure)

Thr -	Ambu 0.60	Val 1.80
Sar 2.60	Meval 0.95	Meala 0.95

d) Actinomycinsäure Z_1-S_7

Ausbeute: 11 mg; amorphes, gelbes Pulver

Schmp. 179° (korr., Berl-Block; Zers.)

Spez. Extinktion bei 442 mμ: α = 16.2 (Methanol)

Aminosäurebestt (qualitativ): alle Aminosäuren des Actinomycins Z_1 außer Threonin; daneben 5-Methylprolin und N-Methylaminobuttersäure.

IV. Die Oxydationsprodukte von Actinomycin Z_1

150 mg Actinomycin Z_1 wurden in 10 ccm Methanol gelöst und mit 25 ccm einer Lösung aus 2 g Perjodsäure in 70 ccm Wasser versetzt. Nach 15 Stdn. schüttelte man erschöpfend mit Chloroform aus und extrahierte aus der Chloroformphase (L_1) saure Produkte mit 5 proz. wäßr. Natriumhydrogencarbonat. Die wäßr. Phase wurde mit 2n HCl angesäuert, erschöpfend mit Chloroform extrahiert (L_2) und beide Chloroformlösungen (L_1 und L_2) i. Vak. zur Trockne eingedampft.

Ausbeuten

Neutrale Oxydationsprodukte: 105 mg (aus L_1)
Saure Oxydationsprodukte: 30 mg (aus L_2)

1. Neutrale Oxydationsprodukte

Der Rückstand aus L_1 (105 mg) wurde an einer Cellulosepulversäule (50 x 2 cm), die mit der Unterphase des Systems Butylacetat - Butanol - Dibutyläther - 5 proz. Kresotinatlösung (6:1:1:8) eingeschlämmt war, im gleichen System chromatographiert. Es entstanden 5 Zonen (Fraktion I bis Fraktion V; nach steigendem R_F-Wert), deren Inhaltsstoffe mit Methanol eluiert wurden. Die Eluate wurden i. Vak. eingedampft, die Rückstände in Chloroform aufgenommen, mit wäßr. Natriumhydrogencarbonat und Wasser gewaschen, getrocknet und i. Vak. eingedampft.

Fraktion V: 50 mg; identisch mit Actinomycin Z_1.
" IV: 6 mg; rotbraunes Produkt, das mit Salzsäure keine Halochromie zeigt und mit methanolischem Zinn(II)-chlorid keine Färbung gibt.
" III: 15 mg; gelbes Oxydationsprodukt, das nur noch schwach Halochromie zeigt.
" II: 10 mg; identisch mit Desaminoactinomycin Z_1.
" I: 5 mg; Oxydationsprodukt, das mit methanolischem Zinn(II)-chlorid Grünfärbung zeigt.

Oxydationsprodukt aus Fraktion III

Ausbeute aus 3 Ansätzen: 35 mg braungelbes, amorphes Pulver
Schmp. 238° (korr., Berl-Block; Zers.)
Absorptionsspektrum (in Methanol): λ_{Max} bei 426 mμ und 292 mμ
Aminosäurebest. (qual.): alle Aminosäuren des Actinomycins Z_1

Wachstumshemmung von St. aureus bis zur Verdünnung 1:200000
(Actinomycin C_3 bis 1:12.6 Mill.)

Hydrierung: Eine Probe wurde in Methanol gelöst, mit einer Spatelspitze Palladium versetzt und hydriert, bis die Lösung farblos war. Nach Reoxydation an der Luft zeigte das entstandene Produkt im System Butylacetat - 10 proz. wäßr. Kresotinat (1:1) den gleichen R_F-Wert wie Actinomycin Z_1. Ausgangsprodukt war nicht mehr nachzuweisen.

2. Saure Oxydationsprodukte

Der Rückstand aus L_2 (70 mg aus 3 Ansätzen) wurde an einer Cellulosepulversäule (50 x 2 cm) im System Butanol - Butylacetat - 3 proz. Kresotinatlösung (7:3:10) chromatographiert. Dabei entwickelte sich neben zwei auf der Säule braun gefärbten Zonen mit kleinem R_F-Wert eine actinomycingelbe Zone, deren Inhaltsstoff mit Methanol eluiert wurde. Nach Abdampfen des Methanols wurde der Rückstand in Wasser aufgenommen, mit verd. Salzsäure angesäuert und mit Chloroform erschöpfend extrahiert. Die Chloroformlösung wurde etwas eingeengt, auf eine Säule aus 10 g neutralem Kieselgel gegeben und mit Chloroform nachgewaschen, bis das Eluat mit wäßr. Eisen(III)-chlorid keine Färbung mehr gab. Dann wurde die Actinomycinsäure mit Methanol von der Säule gewaschen, durch eine G4-Fritte filtriert und eingedampft. Der Rückstand wurde aus Chloroform/Petroläther umgefällt.

Ausbeute: 30 mg; amorphes, rotes Pulver

Schmp. 222° (korr., Berl-Block; Zers.)

Spez. Extinktion bei 442 mμ: α = 16.40 (in Methanol)

Aminosäurebest. (qualitativ): alle Aminosäuren von Actinomycin Z_1; daneben Glycin, Alanin und schwach Serin.

Reduktion: 5 mg des sauren Oxydationsproduktes wurden mit 5 ccm Reduktionslösung (bestehend aus 15 g Aluminiumisopropylat in 100 ccm Benzol und 300 ccm abs. Isopropanol) 12 Stdn. am Rückfluß erhitzt. Dann wurde mit Chloroform versetzt und mit 10 ccm n H_2SO_4 durchgeschüttelt. Nach Abdampfen des Chloroforms wurde der Rückstand hydrolysiert. Im Hydrolysat konnte pherographisch 4-Hydroxy-5-methylprolin (cis- und trans-Form) nachgewiesen werden.

V. Seco-actinomycine Z_1

Eine Lösung von 100 mg Actinomycin Z_1 in 5 ccm konz. Salzsäure erhitzte man 30 Min. im abgeschlossenen Gefäß auf 80° und dampfte anschließend i. Vak. zur Trockne ein. Der Rückstand trennte sich im Pherogramm (Ameisensäure-Essigsäure-Puffer pH 1.9) in zwei Zonen auf; die Hauptmenge wanderte im elektrischen Feld nicht. Die Inhaltsstoffe der beiden gewanderten Fraktionen wurden mit Methanol eluiert, die Eluate eingedampft, die Rückstände in Chloroform aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Die Chloroformphasen wurden getrocknet und i. Vak. eingedampft.

Ausbeuten:

Mono-seco-actinomycin Z_1 (geringere Wanderungsgeschw.): 25 mg
Bis-seco-actinomycin Z_1 (größere Wanderungsgeschw.): 5 mg

Beide Substanzen löste man in je 10 ccm Isopropanol/Wasser (1:1) und hydrierte unter Zusatz einer Spatelspitze Palladium. Dann filtrierte man vom Katalysator ab, versetzte unter Wasserstoff mit 1 ccm n NaOH und hielt die Lösungen 4 Stdn. bei Raumtemperatur. Danach wurde mit 1 ccm n HCl neutralisiert und i. Vak. eingedampft. Den Rückstand löste man in 5 ccm Wasser und adsorbierte an einer mit Wasser eingeschlämmten Säule aus Aluminiumoxid (5 x 1 cm). Es wurde mit 40 ccm Wasser nachgewaschen, das Eluat eingedampft und papierchromatographisch (Butanol - Eisessig - Wasser 4:1:7) und pherographisch (Ameisensäure-Essigsäure-Puffer pH 1.9) auf Aminosäuren und Peptide untersucht.

Gef. Aminosäuren

Mono-seco-actinomycin Z_1: N-Methylvalin; halbquantitativ 0.7 Mol
Bis-seco-actinomycin Z_1: N-Methylvalin und N-Methylalanin in etwa gleicher Menge

Gef. Peptide: keine

VI. Die Actinomycine Z_2, Z_3, Z_4 und Z_5

1. Auftrennung von Actinomycin Z_S-Gemisch

1 g Actinomycin Z_S-Gemisch (an Aluminiumoxid IV von der Hauptmenge Actinomycin Z_1 sowie von der Actinomycin Z_0-Fraktion abgetrennt) wurde ringchromatographisch auf 100 Bogen Schleicher & Schüll 2043 b, mgl. im System Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. Kresotinatlösung (3:1:4) getrennt. Die Chromatogramme wurden zerschnitten, die Inhaltsstoffe der 5 entstandenen Hauptzonen mit Methanol eluiert, die Eluate eingeengt, viel Chloroform zugegeben und die Kresotinsäure durch Ausschütteln mit 5 proz. wäßr. Natriumhydrogencarbonat und Wasser entfernt. Die Chloroformphasen wurden getrocknet und eingedampft. Die erhaltenen Actinomycinpräparate fällte man aus Chloroform/Petroläther um und bestimmte Ausbeute und Reinheit.

Actinomycin Z_1: 120 mg; einheitlich in den Systemen *) 1 und 5.

Actinomycin Z_2: 280 mg; verunreinigt mit geringen Mengen Actinomycin Z_1 sowie einer weiteren Komponente mit einem etwas geringeren R_F-Wert als Actinomycin Z_2 (System 5).

Actinomycin Z_3: 70 mg; verunreinigt mit Actinomycin Z_2 (System 1).

Actinomycin Z_4: 255 mg; verunreinigt mit Actinomycin Z_2 und Spuren von Actinomycin Z_3 (System 1).

Actinomycin Z_5: 55 mg; verunreinigt mit Actinomycin Z_4 und gelb gefärbten Produkten mit größeren R_F-Werten als Actinomycin Z_5 (System 1).

*) System 1: Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. Kresotinat (3:1:4)
System 5: Butylacetat - 10 proz. Kresotinatlösung (1:1)

2. Actinomycin Z_2

a) Isolierung und Charakterisierung

280 mg Actinomycin Z_2, durch präparative Verteilungschromatographie von den übrigen Z-Actinomycinen abgetrennt, wurden zur Entfernung von geringen Mengen Actinomycin Z_1 und anderen Begleitstoffen noch einmal ringchromatographisch auf 20 Papierbogen im System Butylacetat - 10 proz. wäßr. Kresotinat (1:1) chromatographiert. Der mit Methanol eluierte Inhaltsstoff der Hauptzone wurde i. Vak. eingedampft, der Rückstand mit Chloroform aufgenommen und dreimal mit der gleichen Menge 5 proz. wäßr. Natriumhydrogencarbonat und Wasser gewaschen. Das nach Abdampfen des Chloroforms zurückbleibende Actinomycin Z_2 fällte man einmal aus Benzol/Petroläther um und kristallisierte dann aus Benzol/Cyclohexan.

Ausbeute: 105 mg
Schmp. 241° (korr., Berl-Block; Zers)
Spez. Extinktion bei 442 mμ: α = 19.45 (Methanol)
$[\alpha]_D^{20}$: $-352 \pm 7°$ (c = 0.2; in Methanol)

Gef. C 57.65 H 6.62 N 12.40 O 21.60

Aminosäurebest. (Mol/Mol Actinomycin)

Thr	0.63	Val	1.51	Sar	1.67
Meval	0.96	Meala	0.80	Mepro	0.75

Wachstumshemmung von B. subtilis bis zur Verdünnung 1:1.6 Mill. (Actinomycin C_3 bis 1:25.6 Mill.)

Acetylierung: Nach 12 stdg. Acetylierung mit Acetanhydrid/Pyridin (2:1) bei Raumtemperatur entstand ein Produkt mit grösserem R_F-Wert als Actinomycin Z_2. Ausgangsprodukt war nicht mehr nachzuweisen. Im IR-Spektrum tritt eine neue Bande bei 8.15μ auf (C-O-Streckschwingung für Acetate).

b) Die Reduktionsprodukte von Actinomycin Z_2

50 mg Actinomycin Z_2 wurden mit 15 ccm Reduktionslösung (bestehend aus 15 g Aluminiumisopropylat in 100 ccm Benzol und 300 ccm abs. Isopropanol) 12 Stdn. am Rückfluß erhitzt. Die grüne Lösung

versetzte man mit 50 ccm Chloroform und schüttelte mit 10 ccm n H_2SO_4 kräftig durch. Nach Trocknen der Chloroformphase wurde das Lösungsmittel i. Vak. abgedampft.

Der Rückstand zeigte im Papierchromatogramm in den Systemen Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. wäßr. Kresotinat (3:1:4) und Butylacetat - 10 proz. wäßr. Kresotinat (1:1) drei Zonen annähernd gleicher Stärke. Die Gesamtmenge wurde auf 5 Papierbogen im System Butylacetat - 10 proz. wäßr. Kresotinat (1:1) ringchromatographisch getrennt. Die drei entstandenen Zonen (Z_2-I, Z_2-II und Z_2-III; nach steigendem R_F-Wert durch römische Ziffern gekennzeichnet) wurden ausgeschnitten, ihre Inhaltsstoffe mit Methanol eluiert, die Eluate eingedampft und die Rückstände nach Auflösen in Chloroform mit 5 proz. wäßr. Natriumhydrogencarbonat durchgeschüttelt. Die Chloroformphasen wurden getrocknet und i. Vak. eingedampft.

Actinomycin Z_2-III
Ausbeute: 13 mg
Aminosäurebest. (qualitativ): enthält alle Aminosäuren von Actinomycin Z_2 und zusätzlich 4-Hydroxy-5-methylprolin (cis-Form).

Actinomycin Z_2-II
Ausbeute: 14 mg
Aminosäurebest. (qualitativ): enthält alle Aminosäuren von Actinomycin Z_2 und zusätzlich 4-Hydroxy-5-methylprolin (trans-Form).

Actinomycin Z_2-I
Ausbeute: 10 mg
Aminosäurebest. (qualitativ): enthält alle Aminosäuren von Actinomycin Z_2 und zusätzlich 4-Hydroxy-5-methylprolin (cis- und trans-Form).

3. Actinomycin Z_3

a) Isolierung und Charakterisierung

140 mg durch präparative Papierchromatographie von der Hauptmenge der übrigen Z-Actinomycine abgetrenntes Actinomycin Z_3 wurde in

der eben nötigen Menge Benzol gelöst und an einer mit Benzol eingeschlämmten Säule aus Aluminiumoxid IV (15 x 2 cm) adsorbiert. Beim Nachwaschen mit Essigester wanderte eine gelb-rote Zone in die Vorlage. Eine zweite Zone konnte mit Methanol von der Säule gewaschen werden. Am oberen Rand der Säule blieb ein brauner Rückstand. Das Essigestereluat wurde i. Vak. eingedampft. Der Rückstand erwies sich im Papierchromatogramm im System Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. Kresotinatlösung (3:1:4) als einheitliches Actinomycin Z_3. Es konnte aus wenig Essigester durch Zugabe von Cyclohexan in kleinen Prismen kristallisiert werden.

Ausbeute: 85 mg
Schmp. 256° (korr., Berl-Block; Zers.)
Spez. Extinktion bei 442 mμ: α = 18.85 (Methanol)
$[\alpha]_D^{19}$: $-334 \pm 5^\circ$ (c = 0.2; in Methanol)

Gef. C 57.76 H 6.75 N 12.11 O 22.78

Aminosäurebest. (Mol/Mol Actinomycin)

Thr	0.75	Val	1.80	Sar	1.56
Meval	0.91	Meala	0.80	Mepro	0.75

Wachstumshemmung von B. subtilis bis zur Verdünnung 1:3.2 Mill. (Actinomycin C_3 bis 1:25.6 Mill.)

Acetylierung: Eine Probe Actinomycin Z_3, 24 Stdn. mit Acetanhydrid/Pyridin (2:1) bei Raumtemperatur gehalten, zeigte nach Abdampfen des Acetylierungsmittels im Papierchromatogramm im System Butylacetat - 10 proz. Kresotinat (1:1) unverändertes Ausgangsprodukt.

b) Reduktionsprodukte von Actinomycin Z_3

20 mg Actinomycin Z_3 wurden mit 3 ccm Reduktionslösung (bestehend aus 15 g Aluminiumisopropylat in 100 ccm Benzol und 300 ccm abs. Isopropanol) versetzt und 12 Stdn. am Sieden gehalten. Die tiefgrüne Lösung versetzte man mit Chloroform und schüttelte zweimal mit 2n H_2So_4 aus. Die Chloroformphase wurde getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde ringchromatographisch im System Butylacetat - 10 proz. Kresotinatlösung (1:1) in vier

Zonen aufgetrennt (Z_3-I bis Z_3-IV; nach steigendem R_F-Wert durch römische Ziffern gekennzeichnet). Die Inhaltsstoffe der Zonen wurden mit Methanol eluiert, die Eluate eingedampft, die Rückstände in Benzol aufgenommen und mit wäßr. Natriumhydrogencarbonat und Wasser von Kresotinsäure befreit. Die getrockneten Benzolfraktionen photometrierte man zur Bestimmung der Ausbeuten und prüfte im Hydrolysat von Z_3-II und Z_3-IV (6n HCl; 48 Stdn. bei 110°) auf Hydroxyiminosäuren.

Z_3-I : 5 %; am Startkreis verbliebene actinomycingelbe Substanz.
Z_3-II : 60 %; enthält 4-Hydroxy-5-methylprolin (trans-Form).*)
Z_3-III: 5 %
Z_3-IV : 25 %; enthält 4-Hydroxy-5-methylprolin (cis-Form).*)

*)bestimmt im Pherographen bei pH 1.9

Acetylierung: Z_3-II und Z_3-IV lassen sich durch Acetylierung mit Acetanhydrid/Pyridin (2:1) in je ein Produkt mit größerem R_F-Wert im System Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. Kresotinatlösung (3:1:4) überführen.

4. Actinomycin Z_4

a) Isolierung und Charakterisierung

255 mg Actinomycin Z_4, durch präparative Papierchromatographie von der Hauptmenge der anderen Z_S-Actinomycine befreit, wurden noch einmal auf 20 Papierbogen aufgetragen und ringchromatographisch im System Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. wäßr. Kresotinat (3:1:4) aufgetrennt. Die entstandene Hauptzone (Nebenzonen mit den R_F-Werten von Actinomycin Z_2, Actinomycin Z_3 und Actinomycin Z_5 waren außerdem entstanden) wurde ausgeschnitten, ihr Inhaltsstoff mit Methanol eluiert, das Eluat eingeengt, mit Chloroform versetzt und dreimal mit 5 proz. wäßr. Natriumhydrogencarbonat und Wasser ausgeschüttelt. Die getrocknete Chloroformphase dampfte man i. Vak. ein.

Den Rückstand, ein gelbes, amorphes Pulver, löste man in Benzol und gab die Lösung auf eine mit Benzol eingeschlämmte Säule (5 x 2 cm) aus Aluminiumoxid IV. Beim Nachwaschen mit Essigester

wanderte eine breite, rote Zone in die Vorlage. Braungelbe Verunreinigungen blieben am oberen Rand der Säule zurück. Das Essigestereluat wurde eingeengt und durch Zugabe von Cyclohexan Actinomycin Z_4 in dünnen, roten Blättchen kristallisiert. Es zeigte in den Systemen Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. Kresotinatlösung (3:1:4) und (2:1:3) noch eine schwache Zone mit dem R_F-Wert des Actinomycins Z_2, die auch durch nochmaliges Umkristallisieren nicht entfernt werden konnte.

Ausbeute: 90 mg
Schmp. 256° (korr., Berl-Block; Zers.)
Spez. Extinktion bei 442 mμ: α = 19.80 (Methanol)
$[\alpha]_D^{18}$: - 337 ± 5° (c = 0.2; in Methanol)
Gef. C 56.75 H 6.67 N 12.16 O 22.31
Aminosäurebest. (Mol/Mol Actinomycin)

Thr	0.75	Val	2.05	Sar	1.90
Meval	0.85	Meala	0.70	Mepro	0.65

Wachstumshemmung von B. subtilis bis zur Verdünnung 1:12.8 Mill. (Actinomycin C_3 bis 1:25.6 Mill.).

Acetylierung: Eine Probe Actinomycin Z_4, 24 Stdn. mit Acetanhydrid/Pyridin (2:1) bei Raumtemperatur behandelt, zeigte nach Abdampfen des Acetylierungsmittels im System Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. wäßr. Kresotinat (3:1:4) unverändertes Ausgangsprodukt.

b) Die Reduktionsprodukte von Actinomycin Z_4

15 mg Actinomycin Z_4 wurden mit 10 ccm Reduktionslösung (bestehend aus 15 g Aluminiumisopropylat in 100 ccm Benzol und 300 ccm abs. Isopropanol) 15 Stdn. am Rückfluß erhitzt, die grüne Lösung dann mit 50 ccm Chloroform versetzt und mit 10 ccm n H_2SO_4 ausgeschüttelt. Nach Abdampfen des Chloroforms zeigte der Rückstand im System Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. Kresotinatlösung (3:1:4) fünf Zonen, von denen die drei mit den kleinsten R_F-Werten den Actinomycinen Z_2-I, Z_2-II und Z_2-III entsprachen. Die zwei Zonen mit größeren R_F-Werten (Z_4-I und Z_4-II; nach steigendem

R_F-Wert durch römische Ziffern gekennzeichnet) wurden ausgeschnitten, ihre Inhaltsstoffe mit Methanol eluiert, die Eluate eingedampft, die Rückstände in Chloroform aufgenommen, durch Schütteln mit wäßr. Natriumhydrogencarbonat von Kresotinsäure befreit und nach Abdampfen des Chloroforms der Totalhydrolyse (6n HCl; 48 Stdn. bei 110°) unterworfen. Im Hydrolysat von Z_4-I und Z_4-II wurde auf Hydroxyproline geprüft.

Actinomycin Z_4-I : enthält 4-Hydroxy-5-methylprolin (trans-Form)

Actinomycin Z_4-II : enthält 4-Hydroxy-5-methylprolin (cis-Form)

5. Actinomycin Z_5

a) Isolierung und Charakterisierung

120 mg Actinomycin Z_5, aus 2 g Actinomycin Z_S-Gemisch gewonnen, wurde zunächst, um geringe Mengen Actinomycin Z_4 und Produkte mit größeren R_F-Werten zu entfernen, an einer Cellulosepulversäule (30 x 2 cm) im System Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. Kresotinatlösung (3:1:4) chromatographiert. Der Inhaltsstoff der entstandenen Hauptzone wurde mit Methanol eluiert, das Eluat eingedampft, der Rückstand in Benzol gelöst und durch Ausschütteln mit 5 proz. wäßr. Natriumhydrogencarbonat von Kresotinsäure befreit. Das nach Abdampfen des Benzols erhaltene Rohprodukt wurde aus Benzol an einer Aluminiumoxidsäule (10 x 1 cm) der Aktivitätsstufe IV adsorbiert. Beim Nachwaschen mit Essigester eluierte man eine breite, rote Zone, deren Inhaltsstoff sich nach Abdampfen des Essigesters als chromatographisch reines Actinomycin Z_5 erwies.

Ausbeute: 75 mg; kleine Prismen aus Benzol/Cyclohexan
Schmp. 257° (korr., Berl-Block; Zers.)
Spez. Extinktion bei 442 mμ: α = 17.85 (Methanol)

$[\alpha]_D^{20}$: $-298 \pm 5°$ (c = 0.2; in Methanol)

$C_{62}H_{84}N_{12}O_{17}$ (1269.5) Ber. C 58.66 H 6.67 N 13.24 O 21.43
Gef. C 58.40 H 6.65 N 12.85 O 21.25

Aminosäurebest. (Mol/Mol Actinomycin)

Thr 1.40	Val 1.95	Mepro 0.85	
Sar 1.82	Meval 1.15	Meala 0.90	

Wachstumshemmung von B. subtilis bis zur Verdünnung 1:6.4 Mill. (Actinomycin C_3 bis 1:12.8 Mill.).

Acetylierung: Eine Probe blieb nach 24 stdg. Einwirkung von Acetanhydrid/Pyridin (2:1) unverändert.

b) Die Reduktionsprodukte von Actinomycin Z_5

50 mg Actinomycin Z_5 wurden mit einer Lösung von 1 g Aluminiumisopropylat in 5 ccm abs. Benzol und 15 ccm abs. Isopropanol versetzt und die tiefgrüne Lösung 10 Stdn. am Rückfluß erhitzt. Dann wurde mit viel Chloroform versetzt und mit 15 ccm 2n H_2SO_4 durchgeschüttelt. Die wäßr. Phase wurde noch einmal mit wenig Chloroform extrahiert, die Chloroformphasen vereinigt, getrocknet und i. Vak. eingedampft.

Der Rückstand zeigte im Papierchromatogramm zwei Zonen (Z_5-I und Z_5-II; nach steigendem R_F-Wert im System Butylacetat - Dibutyläther - 10 proz. Kresotinatlösung 3:1:4). Die Gesamtmenge wurde im gleichen System ringchromatographisch getrennt, die Inhaltsstoffe der entstandenen Zonen mit Methanol eluiert, die Eluate eingedampft und die Rückstände zwischen Benzol und 5 proz. wäßr. Natriumhydrogencarbonat verteilt, um die Kresotinsäure zu entfernen. Die Benzolphasen wurden getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. abgedampft.

Actinomycin Z_5-I

Ausbeute: 22 mg; amorphes, rotes Pulver

Schmp. 255° (korr., Berl-Block; Zers.)

Aminosäurebest. (qualitativ): alle Aminosäuren des Actinomycins Z_5, zusätzlich 4-Hydroxy-5-methylprolin (trans-Form).

Wachstumshemmung gegen B. subtilis bis zur Verdünnung 1:1.4 Mill. (Actinomycin C_3 bis 1:12.8 Mill.).

Actinomycin Z_5-II

Ausbeute: 12 mg; amorphes, gelb-rotes Pulver

Aminosäurebest. (qualitativ): alle Aminosäuren des Actinomycins Z_5, zusätzlich 4-Hydroxy-5-methylprolin (cis-Form).

Wachstumshemmung von B. subtilis bis zur Verdünnung 1:2.8 Mill. (Actinomycin C_3 bis 1:12.8 Mill.).

VII. Die Z_0-Actinomycine

350 mg Actinomycin Z_0-Gemisch (an Aluminiumoxid IV von der Hauptmenge Actinomycin Z_1 abgetrennt) wurden an einer Cellulosepulversäule im System Butylacetat - Dibutyläther - Butanol - 5 proz. wäßr. Kresotinat (6:1:1:8) chromatographiert. Dabei bildeten sich 5 Zonen (Z_{01}, Z_{02}, Z_{03}, Z_{04} und Z_{05}; nach steigendem R_F-Wert durch arabische Ziffern gekennzeichnet), deren Inhaltsstoffe mit Methanol eluiert wurden. Die Eluate dampfte man ein, löste die Rückstände in Chloroform und schüttelte zur Entfernung der Kresotinsäure zweimal mit 5 proz. wäßr. Natriumhydrogencarbonat und Wasser aus. Nach Abdampfen des Chloroforms wurden die erhaltenen Rohprodukte aus Chloroform/Petroläther umgefällt.

1. Actinomycin Z_{01}

Ausbeute: 50 mg amorphes, gelbes Pulver

Schmp. 235° (korr., Berl-Block; Zers.)

Aminosäurebest.*) (qualitativ):

Threonin, Valin, Sarkosin, N-Methylvalin, N-Methylalanin und 4-Hydroxy-5-methylprolin (trans-Form)

*) nach Totalhydrolyse (6n HCl, 48 Stdn. bei 110°) pherographisch bei pH 1.9 und chromatographisch im System Butanol-Phenol-Eisessig-Citratpuffer pH 6.4 (20:16:1:20) bestimmt.

Im Plattentest gegen B. subtilis unwirksam.

2. Actinomycin Z_{02}

Ausbeute: 2 mg; verunreinigt mit etwas Actinomycin Z_{01}

Aminosäurebest. (qualitativ): wie Actinomycin Z_{01}

Im Plattentest gegen B. subtilis sehr kleine Hemmzonen.

3. Actinomycin Z_{03}

Ausbeute: 77 mg; amorphes, gelbes Pulver

Schmp. 249° (korr., Berl-Block; Zers.)

Aminosäurebest. (qualitativ): wie Actinomycin Z_{01}, außerdem 5-Methylprolin

4. Actinomycin Z_{04}

Ausbeute: 115 mg; identisch mit Actinomycin Z_1.

5. Fraktion Z_{05} ; 90 mg; Gemisch braungelber Zersetzungsprodukte.

VIII. Synthesen von Vergleichsaminosäuren

1. 1.2-Dicarbäthoxy-5-methyl-pyrrolidol-4-tosylat (115)

10 g 1.2-Dicarbäthoxy-5-methyl-pyrrolidol-(4) wurden in 20 ccm trockenem Pyridin gelöst, mit 8 g p-Toluolsulfochlorid versetzt und 24 Stdn. bei 4° aufbewahrt. Die Lösung wurde dann auf Eis gegossen und mit 200 ccm n HCl versetzt. Es fiel ein dunkelbraunes Öl aus, das mit Chloroform extrahiert wurde. Nach Abdampfen des Chloroforms wurde das erhaltene Rohprodukt (12 g) sofort in die nächste Stufe eingesetzt.

2. 4-Hydroxy-5-methylprolin (114)

12 g 115 löste man in 50 ccm Methanol und erhitzte mit einer heiß filtrierten Lösung aus 36 g krist. Bariumhydroxid in 400 ccm Wasser 12 Stdn. unter Rückfluß zum Sieden. Die noch heiße Lösung wurde bis pH 3.5 mit 2n H_2SO_4 versetzt und das ausgefallene Bariumsulfat abzentrifugiert. Der wäßr. Überstand wurde i. Vak. auf 100 ccm eingeengt und unter Rückfluß mit 15 g Kupfercarbonat 1 Stde. gekocht. Dann wurde heiß filtriert und auf 25 ccm eingeengt. Beim Abkühlen kristallisierte das Kupfersalz des 4-Hydroxy-5-methylprolins aus, das abfiltriert und i. Vak. getrocknet wurde.

Ausbeute: 3.2 g, d. s. 51 % d. Th., bez. auf 115

3 g Kupfersalz wurden in 200 ccm Wasser gelöst und die Lösung mit Schwefelwasserstoffgas gesättigt. Das ausgefallene Kupfersulfid wurde abfiltriert, die hellbraun gefärbte Lösung mit Aktivkohle entfärbt, filtriert und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand konnte aus Wasser/Aceton in derben Nadeln kristallisiert werden.

Ausbeute: 1.15 g, d.s. 55 % d. Th., bez. auf das Kupfersalz.

Schmp. 212° (korr., Berl-Block)

$C_6H_{11}NO_3$ (145.16)	Ber.	C 49.64	H 7.64	N 9.65
	Gef.	C 49.61	H 7.66	N 9.71

3. 4-Methylprolin

a) 2-Cyanpropylmalonester-(1) (116)

Zu 2.3 g Natrium in 70 ccm abs. Äthanol gab man 320 g frisch destillierten Malonester und tropfte unter Rühren 64 g Methacrylsäurenitril in solchen Anteilen zu, daß die Temperatur nicht über 40° stieg. Nach 10 stdg. Stehen bei Raumtemperatur wurde i. Hochvak. fraktioniert.

$Sdp._{0.2\ mm}$: 112 -115°

Ausbeute: 55 g farbloses, viskoses Öl; d. s. 25 % d. Th., bez. auf Methacrylsäurenitril

$C_{11}H_{17}NO_4$	(227.3)	Ber.	C 58.14	H 7.54	N 6.17
		Gef.	C 57.98	H 7.55	N 6.02

b) 3-Carbäthoxy-5-methylpiperidon-(2) (117)

40 g 116 wurden in 150 ccm Äthanol gelöst, mit 2 g Raney-Nickel versetzt und bei 80° und 70 atm. 5 Stdn. hydriert. Das Lösungsmittel dampfte man i. Vak. ab und rührte den Rückstand in 200 ccm Petroläther ein. Der ausgefallene kristalline Niederschlag wurde abfiltriert und i. Vak. getrocknet.

Ausbeute: 26.5 g farblose Kristalle, d. s. 81.5 % d. Th., bez. auf 116

Schmp. 103° (korr., Berl-Block)

$C_9H_{15}NO_3$	(185.2)	Ber.	C 58.37	H 8.16	N 7.56
		Gef.	C 58.37	H 8.15	N 7.61

c) 3-Chlor-3-carbäthoxy-5-methylpiperidon-(2) (118)

Eine Mischung aus 5 ccm Sulfurylchlorid und 10 ccm trockenem Chloroform gab man tropfenweise unter Rühren zu einer Lösung aus 10 g 117 in trockenem Chloroform. Der nach Abdampfen des Chloroforms zurückbleibende Rückstand wurde aus Äthylacetat/Petroläther kristallisiert.

Ausbeute: 8 g, d. s. 68 % d. Th., bez. auf 117

Schmp. 83° (korr., Berl-Block)

$C_9H_{13}NO_3Cl$	(218.7)	Ber.	N 6.32	
		Gef.	N 6.25	

d) 2-Chlor-4-methyl-5-aminovaleriansäure-hydrochlorid (119)

5 g 118 wurden 5 Stdn. mit 50 ccm konz. Salzsäure am Rückfluß gekocht, die dunkelbraune Lösung mit Aktivkohle entfärbt und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde direkt zum nächsten Schritt verwandt.

e) 4-Methylprolin-hydrochlorid

Den rohen Rückstand 119 löste man in 20 ccm Wasser und versetzte mit einer Lösung aus 15 g Natriumhydroxid in 30 ccm Wasser. Nach 48 stdg. Stehen bei Raumtemperatur wurde mit konz. Salzsäure eben angesäuert und die Lösung zur Trockne eingedampft. Den teils festen, teils sirupösen Rückstand extrahierte man erschöpfend mit heißem abs. Äthanol und dampfte die alkoholische Lösung i. Vak. zur Trockne ein. Das zurückbleibende ölige Rohprodukt wurde mit einer Lösung aus 50 ccm Wasser und 10 ccm konz. Salzsäure 1 Stde. gekocht. Nach Abdampfen der Salzsäure kristallisierte das entstandene 4-Methylprolin-hydrochlorid aus wenig Isopropanol.

Ausbeute: 3.0 g, d. s. 79 % d. Th., bez. auf 118

f) 4-Methylprolin (120)

2.5 g 4-Methylprolin-hydrochlorid wurden in 20 ccm trockenem Chloroform suspendiert und 3.75 ccm Triäthylamin langsam unter gutem Rühren zugefügt. Es wurde noch 2 Stdn. weitergerührt und anschließend das ausgefallene 4-Methylprolin abfiltriert. Es konnte aus wenig Äthanol in derben Nadeln kristallisiert werden.
Ausbeute: 1.8 g, d. s. 90 % d. Th., bez. auf (e)
Schmp. 219° (korr., Berl-Block)

$C_6H_{11}NO_2$	(129.2)	Ber.	C 55.79	H 8.58	N 10.85
		Gef.	C 55.31	H 8.54	N 10.74

4. 3-Methylprolin

a) 1-Cyanpropylmalonester-(2) (121)

Zu 2.3 g Natrium in 70 ccm abs. Äthanol wurden 320 g frisch destillierter Malonester gegeben und unter Rühren 64 g Crotylcyanid in solchen Anteilen zugefügt, daß die Temperatur nicht

über 40° stieg. Nach 10 stdg. Stehen bei Raumtemperatur wurde i. Hochvak. fraktioniert.

$Sdp._{0.2\ mm}$: 105°

Ausbeute: 80 g farbloses, fast geruchloses Öl; d. s. 36 % d. Th., bez. auf Crotylcyanid

$C_{11}H_{17}NO_4$ (227.26) Ber. C 58.14 H 7.54 N 6.17
Gef. C 57.95 H 7.56 N 6.08

b) 3-Carbäthoxy-4-methylpiperidon-(2) (122)

60 g 121 wurden in 200 ccm Äthanol gelöst, die Lösung mit 2 g Raney-Nickel versetzt und bei 80° und 70 atm. 5 Stdn. hydriert. Das Lösungsmittel dampfte man i. Vak. ab und rührte den Rückstand in 200 ccm Petroläther ein. Der ausgefallene kristalline Niederschlag wurde abfiltriert und im Vakuumexsiccator getrocknet.

Ausbeute: 40 g, d. s. 82 % d. Th., bez. auf 121

Schmp. 86° (korr., Berl-Block)

$C_9H_{15}NO_3$ (185.2) Ber. C 58.37 H 8.16 N 7.56
Gef. C 58.24 H 8.24 N 7.58

c) 3-Chlor-3-carbäthoxy-4-methylpiperidon-(2) (123)

Eine Mischung aus 14 ccm Sulfurylchlorid und 30 ccm trockenem Chloroform gab man unter Rühren tropfenweise zu einer Lösung aus 28 g 122 in 40 ccm trockenem Chloroform. Der nach dem Abdampfen des Chloroforms zurückbleibende Rückstand wurde aus Äthylacetat/Petroläther kristallisiert.

Ausbeute 24.5 g, d.s. 74 % d. Th., bez. auf 122

Schmp. 67° (korr., Berl-Block)

$C_9H_{13}NO_3Cl$ (218.7) Ber. N 6.32
Gef. N 6.25

d) 2-Chlor-3-methyl-5-aminovaleriansäure-hydrochlorid (124)

15 g 123 erhitzte man 5 Stdn. mit 50 ccm konz. Salzsäure am Rückfluß. Die braungelbe Lösung wurde mit Aktivkohle entfärbt und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde direkt zum nächsten Schritt verwandt.

e) 3-Methylprolin-hydrochlorid

Der Rückstand 124 wurde in 25 ccm Wasser gelöst und mit einer Lösung aus 20 g Natriumhydroxid in 35 ccm Wasser alkalisch gemacht. Nach 46 stdg. Stehen bei Raumtemperatur wurde mit konz. Salzsäure eben angesäuert und die Lösung zur Trockne eingedampft. Den Rückstand extrahierte man erschöpfend mit heißem abs. Äthanol und dampfte die alkoholische Lösung i. Vak. zur Trockne ein. Das zurückbleibende ölige Rohprodukt wurde mit einer Lösung aus 50 ccm Wasser und 10 ccm konz. Salzsäure 1 Stde. am Rückfluß gekocht. Nach Abdampfen der Salzsäure konnte das entstandene 3-Methylprolin-hydrochlorid aus wenig Isopropanol kristallisiert werden.

Ausbeute: 9.5 g, d. s. 84 % d. Th., bez. auf 123

f) 3-Methylprolin (125)

5 g 3-Methylprolin-hydrochlorid wurden in 25 ccm trockenem Chloroform suspendiert und 7.5 ccm Triäthylamin langsam unter gutem Rühren zugefügt. Es wurde noch 2 Stdn. weitergerührt und das ausgefallene 4-Methylprolin abfiltriert. Das Rohprodukt konnte aus wenig Äthanol in büschelförmigen Nadeln kristallisiert werden.

Ausbeute: 2.7 g, d. s. 69 % d. Th., bez. auf (e)

Schmp. 207° (korr., Berl-Block)

$C_6H_{11}NO_2$	(129.2)	Ber.	C 55.79	H 8.58	N 10.85
		Gef.	C 56.02	H 8.62	N 10.71

Literaturverzeichnis

1) S. A. Waksman und H. B. Woodruff, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 45, 609 (1940)
2) S. A. Waksman und H. B. Woodruff, J. Bacteriol. 42, 231 (1941)
3) H. J. Robinson und S. A. Waksman, J. Pharmac. exp. Ther. 74, 25 (1942)
4) Chr. Hackmann, Z. Krebsforsch. 58, 607 (1952)
5) Chr. Hackmann, Z. Krebsforsch. 60, 250 (1954)
6) Chr. Hackmann und G. Schmidt-Kastner, Z. Krebsforsch. 61, 607 (1957)
7) H. Brockmann, N. Grubhofer, W. Kass und H. Kalbe, Chem. Ber. 84, 260 (1951)
8) H. Brockmann und N. Pfennig, Naturwissenschaften 39, 429 (1952)
9) H. Brockmann und H. Gröne, Naturwissenschaften 40, 222 (1952)
10) H. Brockmann und H. Gröne, Naturwissenschaften 41, 65 (1954)
11) H. Brockmann, H. Linge und H. Gröne, Naturwissenschaften 40, 224 (1953)
12) H. Brockmann und H. Muxfeldt, Angew. Chem. 68, 69 (1956)
13) H. Brockmann und H. Muxfeldt, Chem. Ber. 91, 1242 (1958)
14) J. H. Manegold, Dissertation Göttingen 1959
15) H. Brockmann, Angew. Chem. 72, 936 (1960)
16) H. Brockmann, H. Gröne und J. Timm, Naturwissenschaften 42, 125 (1955)
17) H. Brockmann und J. H. Manegold, Hoppe-Seyler's Z. physiol Chem. 343, 86 (1965)
18) H. Brockmann und J. H. Manegold, Naturwissenschaften 45, 310 (1958)
19) W. Sunderkötter, Dissertation Göttingen 1958
20) G. Döring, Dissertation Göttingen 1960
21) R. Bossi, R. Hütter, W. Keller-Schierlein, L. Neipp und H. Zähner, Helv. Chim. Acta 41, 1645 (1958)
22) H. Brockmann und E. A. Stähler, Naturwissenschaften 52, 391 (1965)
23) Th. Wieland und U. Wintermeyer, Chem. Ber. 90, 1721 (1957)

24) J. C. Sheehan und J. G. Whitney, J. Amer. chem. Soc. 84, 3980 (1962)
25) E. A. Stähler, Diplomarbeit, Göttingen 1964
26) H. Brockmann und B. Franck, Angew. Chem. 67, 303 (1955)
27) Th. Wieland und H. Wiegandt, Angew. Chemie, 67, 399 (1955)
28) H. Brockmann und J. H. Manegold, Naturwissenschaften 51, 383 (1964)
29) H. Brockmann und B. Franck, Angew. Chem. 68, 68 (1956)
30) A. Boiteux, Diplomarbeit Göttingen 1958
31) Th. Wieland, Angew. Chem. 72, 892 (1960)
32) H. E. Carter und D. B. Melville, J. biol. Chem. 133, 109 (1940)
33) H. Brockmann und W. Sunderkötter, Naturwissenschaften 47, 229 (1960)
34) J. Ammann, Dissertation Göttingen 1962
35) E. Katz und H. Weissbach, J. biol. Chem. 238, 666 (1963)
36) J. B. Jepson und J. Smith, Nature (London) 172, 1100 (1953)
37) H. Brockmann und J. H. Manegold, Chem. Ber. 95, 1081 (1962)
38) R. Kuhn und G. Osswald, Chem. Ber. 89, 1423 (1956)
39) R. J. Abraham und K. A. Mc. Lauchlan, Mol. Phys. 5, 512 (1962)
40) R. Gaudry und C. Godin, J. Amer. chem. Soc. 76, 139 (1954)
41) N. F. Albertson und J. L. Fillman, J. Amer. chem. Soc. 71, 2818 (1949)

Herrn Dr. R. Brinkmann danke ich für unermüdliche Unterstützung bei der Kultivierung des Actinomycin Z-Bildners,

Fräulein B. Mann und Herrn G. Opitz für sorgfältige und gewissenhafte Mitarbeit bei der Ausführung der Versuche,

den Herren Dr. O. Pfundt und M. Beller für die Durchführung der Mikroelementaranalysen,

Frau E. von Trotha für die Ausführung der mikrobiologischen Testverfahren,

den Herren Dr. K.-H. Schulmeyer, Dr. R. Zunker und Dipl.-Chem. K. Zellerhoff für die Messung der IR-Spektren,

sowie Frau I. Beller für die Messung der NMR-Spektren.

Lebenslauf

Am 23. Mai 1938 wurde ich als Sohn des Fabrikanten Heinrich Stähler und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Schacht, in Stade geboren. Von 1945 bis 1949 besuchte ich die Volksschule in Twielenfleth/Kr. Stade. Dann wurde ich Schüler des Athenaeums in Stade, dessen mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig ich bis zum Abitur im März 1958 besuchte.

Im Wintersemester 1958/59 begann ich an der Georg-August-Universität in Göttingen zunächst mit dem Studium der Physik und wechselte ab Sommersemester 1959 zur Chemie über. Nach Abschluß der anorganischen und organischen Praktika bestand ich am 24. Juli 1962 das Diplom-Vorexamen. Nach Beendigung eines Zusatzpraktikums für Organiker arbeitete ich in der Zeit von Januar 1963 bis Februar 1964 im Organisch-Chemischen Institut der Universität unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Hans Brockmann an meiner Diplomarbeit mit dem Titel "Beitrag zur Konstitutionsermittlung des Actinomycins H_5". Das mündliche Diplom-Hauptexamen bestand ich am 27. Februar 1964 mit dem Prädikat "sehr gut".

In der folgenden Zeit arbeitete ich unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Hans Brockmann an der vorliegenden Dissertation. Im Januar 1965 wurde mir die Verwaltung einer Assistenten-Stelle im Organisch-Chemischen Institut übertragen.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren:

Prof. Dr. H. Brockmann, Prof. Dr. A. Flammersfeld, Prof. Dr. B. Franck, Prof. Dr. E. U. Franck, Prof. Dr. W. H. Fuchs, Prof. Dr. G. Gattow, Prof. Dr. O. Glemser, Prof. Dr. R. Hilsch, Prof. Dr. W. Jost, Prof. Dr. W. Lüttke, Prof. Dr. M. Schäfer, Prof. Dr. A. Schneider, Prof. Dr. U. Schöllkopf, Prof. Dr. H. Strehlow, Prof. Dr. J. Zemann.